

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Juli 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/057465 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/82,
15/53, 15/11, 9/02, C12P 7/62, 7/64, C12Q 1/68, C07K
16/40, G01N 33/573, C11B 1/00

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; 67056
Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/00462

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. Januar 2002 (18.01.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 02 337.5 19. Januar 2001 (19.01.2001) DE

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LERCHL, Jens
[DE/SE]; Onsjövägen 17, S-26831 Svalöv (SE). RENZ,
Andreas [DE/DE]; Heinrich-von-Kleist-Str. 6, 67117
Limburgerhof (DE). HEINZ, Ernst [DE/DE]; Püt-
tkampsweg 13, 22609 Hamburg (DE). DOMERGUE,
Frederic [FR/DE]; Bahrenfelder Steindamm 98, 22761
Hamburg (DE). ZÄHRINGER, Ulrich [DE/DE];
Theodor-Storm-Strasse 34a, 22926 Ahrensburg (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYUNSATURATED FATTY ACIDS, NOVEL BIOSYNTHESIS GENES AND
NOVEL PLANT EXPRESSION CONSTRUCTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG MEHRFACH UNGESAETTIGTER FETTSÄUREN, NEUE
BIOSYNTHESEGENE SOWIE NEUE PFLANZLICHE EXPRESSIONSKONSTRUKTE

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing unsaturated fatty acids comprising at least two double bonds, and a method for producing triglycerides having an increased content of polyunsaturated fatty acids comprising at least two double bonds. The invention also relates to the advantageous use of the nucleic acid sequences of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 or SEQ ID NO: 18 in the inventive methods, and for producing a transgenic organism, preferably a transgenic plant or a transgenic micro-organism having an increased content of fatty acids, oils or lipids containing unsaturated C₁₈, C₂₀, or C₂₂ fatty acids. The invention further relates to novel desaturases comprising the sequences of SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 and SEQ ID NO: 11, or the homologues, derivatives or analogues thereof, and gene constructs comprising said genes or the homologues, derivatives or analogues thereof, in addition to the use of the same, either alone or combined with biosynthesis genes of polyunsaturated fatty acids, as advantageously represented in SEQ ID NO: 7 and SEQ ID NO: 9. Furthermore, the invention relates to isolated nucleic acid sequences, expression cassettes containing said nucleic acid sequences, vectors, and transgenic organisms containing at least one nucleic acid sequence or an expression cassette. The invention also relates to unsaturated fatty acids comprising at least two double bonds and triglycerides having an increased content of unsaturated fatty acids comprising at least two double bonds, and the use of the same. Finally, the invention relates to multi-expression cassettes for seed-specific expression, in addition to vectors or organisms comprising a desaturase gene, either alone or combined with other desaturases having the sequence of SEQ ID NO: 7 and/or elongase genes having the sequence of ID NO: 9 or the homologues, derivatives or analogues of the same, expressed by means of the above-mentioned expression cassettes.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen und/oder ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit erhöhtem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens höchtem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen. Die Erfindung betrifft weiterhin die vorteilhafte Verwendung der Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 oder SEQ ID NO: 18 im Verfahren sowie zur Herstellung eines transgenen Organismus bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit ungesättigten C₁₈-, C₂₀-, oder C₂₂-Fettsäuren. Die Erfindung betrifft weiterhin neue Desaturasen mit den in den Sequenzen SEQ ID No. 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 und SEQ ID NO: 11 oder seine Homologen, Derivate oder Analoga sowie Genkonstrukte, die diese Gene oder ihre Homologen, Derivate oder Analoga umfasst sowie ihre Verwendung allein oder in Kombination mit Biosynthesegenen polyungesättigter Fettsäuren wie vorteilhaft in SEQ ID NO: 7 und SEQ ID NO: 9 dargestellt. Ausserdem betrifft die Erfindung isolierte Nukleinsäuresequenzen; Expressionskassetten enthaltend die Nukleinsäuresequenzen. Vektoren und transgene Organismen enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz bzw. eine Expressionskassette. Ausserdem betrifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen und deren Verwendung.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 02/057465 A2



(74) **Anwalt:** GOLDSCHIED, Bettina; BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren, neue Biosynthesegene sowie neue pflanzliche Expressionskonstrukte

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen und/oder ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit erhöhtem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen. Die Erfindung betrifft weiterhin die vorteilhafte Verwendung der Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder 11 im Verfahren sowie zur Herstellung eines transgenen Organismus bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit ungesättigten C₁₈-, C₂₀-, oder C₂₂-Fettsäuren.

Die Erfindung betrifft weiterhin neue Desaturasen mit den in den Sequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 und SEQ ID NO: 11 oder seine Homologen, Derivate oder Analoga sowie Genkonstrukte, die diese Gene oder ihre Homologen, Derivate oder Analoga umfasst sowie Ihre Verwendung allein oder in Kombination mit Biosynthesegenen polyungesättigter Fettsäuren wie vorteilhaft in SEQ ID NO: 7 und SEQ ID NO: 9 dargestellt.

Außerdem betrifft die Erfindung isolierte Nukleinsäuresequenzen; Expressionskassetten enthaltend die Nukleinsäuresequenzen, Vektoren und transgene Organismen enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz bzw. eine Expressionskassette. Außerdem betrifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen und deren Verwendung.

Die Erfindung betrifft zudem Multiexpressionskassetten zur samen-spezifischen Expression und Vektoren oder Organismen, die ein Desaturasegen allein oder in Kombination mit weiteren Desaturasen mit der Sequenz SEQ ID NO: 7 und/oder Elongasegenen mit der Sequenz ID NO: 9 oder seine Homologen, Derivate oder Analoga unter Verwendung besagter Expressionskassetten umfassen.

Eine Reihe von Produkten und Nebenprodukten natürlich vorkommender Stoffwechselprozesse in Mikroorganismen, tierischen und pflanzlichen Zellen sind für viele Industriezweige, einschließlich der Futtermittel-, Nahrungsmittel-, Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie, nützlich. Zu diesen gemeinsam als

2

"Feinchemikalien" bezeichneten Molekülen gehören beispielsweise Lipide und Fettsäuren, unter denen eine beispielhafte Klasse die mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind. Fettsäuren und Triglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem ob es sich um freie gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren oder um Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet, so werden beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. PUFAs haben weiterhin einen positiven Einfluss auf den Cholesterinspiegel im Blut von Menschen und eignen sich daher zum Schutz gegen Herzkrankheiten. So finden sie in verschiedenen diätischen Lebensmitteln oder Medikamenten Anwendung.

Besonders geeignete Mikroorganismen zur Herstellung von PUFAs sind Mikroorganismen wie Thraustochytrien oder Schizochytrien-Stämme, Algen wie *Phaeodactylum tricornutum* oder *Cryptothecodinium*-Arten, Ciliaten, wie *Stylonychia* oder *Colpidium*, Pilze, wie *Mortierella*, *Entomophthora* oder *Mucor*. Durch Stammselektion ist eine Anzahl von Mutantenstämmen der entsprechenden Mikroorganismen entwickelt worden, die eine Reihe wünschenswerter Verbindungen, einschließlich PUFAs, produzieren. Die Selektion von Stämmen mit verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls ist jedoch ein zeitraubendes und schwieriges Verfahren.

Alternativ kann die Produktion von Feinchemikalien geeigneterweise über die Produktion von Pflanzen, die so entwickelt sind, dass sie die vorstehend genannten PUFAs herstellen, im großen Maßstab durchgeführt werden. Besonders gut für diesen Zweck geeignete Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten wie Raps, Canola, Lein, Soja, Sonnenblumen, Borretsch und Nachtkerze. Aber auch andere Nutzpflanzen, die Öle oder Lipide und Fettsäuren enthalten, sind gut geeignet, wie in der eingehenden Beschreibung dieser Erfindung erwähnt. Mittels herkömmlicher Züchtung ist eine Reihe von Mutantpflanzen entwickelt worden, die ein Spektrum an wünschenswerten Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen produzieren. Die Selektion neuer Pflanzensorten mit verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls ist jedoch ein zeitaufwändiges und schwieriges Verfahren oder sogar unmöglich, wenn die Verbindung in der entsprechenden Pflanze nicht natürlich vorkommt, wie im Fall von mehrfach ungesättigten C₁₈-, C₂₀-Fettsäuren und C₂₂-Fettsäuren und solchen mit längeren Kohlenstoffketten.

3

Aufgrund der positiven Eigenschaften ungesättigter Fettsäuren hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine Δ -9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine Δ -15-Desaturase in WO 94/11516 wird eine Δ -12-Desaturase beansprucht. Δ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, 10 WO 96/21022 und WO 99/27111 beschrieben. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 15 649-659 beschrieben. In WO 96/13591 wird eine Δ -6-Palmitoyl-ACP-Desaturase beschrieben und beansprucht. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und charakterisieren sind 20 (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141-12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792).

In Hefen konnte sowohl eine Verschiebung des Fettsäurespektrums zu ungesättigten Fettsäuren hin als auch eine Steigerung der 25 Produktivität nachgewiesen werden (siehe Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659, Napier et al., Biochem. J., Vol. 330, 1998: 611-614). Die Expression der verschiedenen Desaturasen in transgenen Pflanzen zeigte allerdings nicht den gewünschten Erfolg. Eine Verschiebung des Fettsäurespektrum zu ungesättigten Fett- 30 säuren hin konnte gezeigt werden, gleichzeitig zeigte sich aber, dass die Syntheseleistung der transgenen Pflanzen stark nachließ, das heißt gegenüber den Ausgangspflanzen konnten nur geringere Mengen an Ölen isoliert werden.

35 Weder in Hefen noch in Pflanzen werden natürlicherweise mehrfach ungesättigte C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) hergestellt.

40

Nach wie vor besteht daher ein großer Bedarf an neuen Genen, die für Enzyme kodieren, die an der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind und es ermöglichen, diese in einem technischen Maßstab herzustellen. Keines der bisher bekannten 45 biotechnologischen Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren liefert die vorgenannten Fettsäuren in wirtschaftlich nutzbaren Mengen.

4

Es bestand daher die Aufgabe weitere Enzyme für die Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren zur Verfügung zu stellen. Und diese Enzyme gegebenenfalls mit anderen Enzymen in einem Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren zu
5 verwenden. Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Fettsäureestern mit einem erhöhtem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen gelöst, dadurch gekennzeichnet, man mindestens eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe:

10

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
- 15 b) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen erhalten werden,
- 20 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf Amino-
- 25 säureebene aufweisen, ohne dass die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist,

in einen Fettsäureester produzierenden Organismus einbringt, anzieht und die dem Organismus enthaltenden Fettsäureester iso-
30 liert.

Bei den im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen handelt es sich um isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -5-, Δ -6- oder Δ -12-Desaturaseaktivität
35 codieren.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden vorteilhaft Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C₁₈-, C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuremolekülen mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäureester her-
40 gestellt. Bevorzugt enthalten diese Fettsäuremoleküle drei, vier oder fünf Doppelbindungen und führen vorteilhaft zur Synthese von Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA) oder Docosahexaensäure (DHA).

45 Die Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C₁₈-, C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuremolekülen können aus den Organismen, die für die Herstellung der Fettsäureester verwendet wurden, in Form eines Öls

5

oder Lipids beispielsweise in Form von Verbindungen wie Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide, Phospholipide, Monoacylglyceride, Diacylglyceride, Triacylglyceride oder sonstige Fettsäureester, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen enthalten, isoliert werden.

- Als Organismus für die Herstellung im erfindungsgemäßen Verfahren kommen prinzipiell alle prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen wie prokaryontische oder eukaryontische Mikroorganismen wie gram-positive oder gram-negative Bakterien, Pilze, Hefen, Algen, Ciliaten, tierische oder pflanzliche Zellen, Tiere oder Pflanzen wie Moose, zweikeimblättrige oder einkeimblättrige Pflanzen in Frage. Vorteilhaft werden Organismen im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet, die zu den Öl-produzierenden Organismen gehören, das heißt die für die Herstellung von Ölen verwendet werden, wie Mikroorganismen wie *Cryptocodium*, *Thraustochytrium*, *Phaeodactylum* und *Mortierella*, *Entomophthora*, *Mucor*, *Cryptocodium* sowie andere Algen oder Pilze sowie Tiere oder Pflanzen, insbesondere Pflanzen bevorzugt Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Sojabohne, Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Safflor, Nachtkerze, Lein, Soja, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) oder Feldfrüchte, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölplume, Kokosnuß) sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Soja, Erdnuß, Raps, Canola, Lein, Nachtkerze, Sonnenblume, Safflor oder Bäume (Ölpalme, Kokosnuß).

- Das erfindungsgemäße Verfahren beinhaltet entweder die Züchtung eines geeigneten transgenen Organismus bzw. transgenen Mikroorganismus oder die Züchtung von transgenen Pflanzenzellen, -geweben, -organen oder ganzen Pflanzen, umfassend die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gegebenenfalls in Verbindungen mit den in SEQ ID NO: 7 und/oder SEQ ID NO: 9 dargestellten Sequenzen allein oder in Kombination mit Sequenzen von Expressionskonstrukten aus SEQ ID NO: 13-17 oder ihre Homologen, Derivate oder Analoga oder ein Genkonstrukt, das die SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 ggf. in Verbindung mit SEQ ID NO: 7 und/oder 9 oder ihre Homologen, Derivate oder Analoga umfasst, oder einen Vektor, der diese Sequenz oder das Genkonstrukt umfasst, welches die Expression erfindungsgemäßer Nukleinsäuremoleküle herbeiführt, so dass eine Feinchemikalie produziert wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform

6

- umfasst das Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens einer Zelle, die eine solche erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen enthält, wobei eine Zelle mit einer Desaturasenukleinsäuresequenz, einem Genkonstrukt oder einem Vektor, welche die
- 5 Expression einer erfindungsgemäßen Desaturasenukleinsäure allein oder in Kombination herbeiführen, transformiert wird. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens der Feinchemikalie aus der Kultur. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform gehört
- 10 die Zelle zur Ordnung der Ciliaten, zu Mikroorganismen, wie Pilzen, oder zum Pflanzenreich, insbesondere zu Ölfruchtpflanzen, besonders bevorzugt sind Mikroorganismen oder Ölfruchtpflanzen beispielsweise Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Soja, Safflower (Distel), Sonnenblumen oder Borretsch.
- 15 Unter transgen im Sinne der Erfindung ist zu verstehen, daß die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren nicht an ihrer natürlichen Stelle im Genom eines Organismus sind, dabei können die Nukleinsäuren homolog oder heterolog exprimiert werden. Transgen bedeutet
- 20 aber auch, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an ihrem natürlichen Platz im Genom eines Organismus sind, dass jedoch die Sequenz gegenüber der natürlichen Sequenz verändert wurde und/oder dass die Regulationssequenzen, der natürlichen Sequenzen verändert wurden. Bevorzugt ist unter transgen die Expression
- 25 der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an nicht natürlicher Stelle im Genom zu verstehen, das heißt eine homologe oder bevorzugt heterologe Expression der Nukleinsäuren liegt vor. Bevorzugte transgene Organismen sind die oben genannten transgenen Pflanzen bevorzugt Ölfruchtpflanzen.
- 30 Aus den im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureestern lassen sich die enthaltenden mehrfach ungesättigten Fettsäuren beispielsweise über eine Alkalibehandlung wie wässrige KOH oder NaOH vorteilhaft in Gegenwart eines Alkohols wie Methanol
- 35 oder Ethanol freisetzen und isolieren über beispielsweise Phasentrennung und anschließender Ansäuerung über z.B. H_2SO_4 .
- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Öle, Lipide und/oder Fettsäuren, die mindestens zwei Doppelbindungen in den Fettsäure-
- 40 molekülen bevorzugt drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten, die nach dem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden. Auch sind Zusammensetzungen, die die genannten Öl-, Lipid- und/oder Fettsäuren enthalten, sowie die Verwendung der Öle, Lipide und/oder Fettsäuren oder der Zusammen-
- 45 setzungen in Futter, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika ein weiterer Erfindungsgegenstand.

- Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Modulation der Produktion eines Moleküls durch einen Mikroorganismus. Diese Verfahren umfassen das Zusammenbringen der Zelle mit einer Substanz, welche die erfindungsgemäßen
- 5 Desaturaseaktivität allein oder in Kombination oder die Desaturasenukleinsäureexpression moduliert, so dass eine zell-assoziierte Aktivität relativ zu der gleichen Aktivität in Abwesenheit der Substanz verändert wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird/werden ein oder zwei Stoffwechselweg(e)
- 10 der Zelle für Lipide und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzyme moduliert oder der Transport von Verbindungen über diese Membranen moduliert, so dass die Ausbeute oder die Rate der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie durch diesen Mikroorganismus verbessert ist. Die Substanz, welche die Desaturase-
- 15 aktivität moduliert, kann eine Substanz sein, welche die Desaturaseaktivität oder Desaturasenukleinsäureexpression stimuliert oder die als Zwischenprodukt bei der Fettsäurebiosynthese verwendet werden kann. Beispiele für Substanzen, welche die Desaturaseaktivität oder Desaturasenukleinsäureexpression
- 20 stimulieren, sind u.a. kleine Moleküle, aktive Desaturasen sowie desaturasenkodierende Nukleinsäuren, die in die Zelle eingebracht worden sind. Beispiele für Substanzen, welche die Desaturaseaktivität oder -Expression hemmen, sind u.a. kleine Moleküle und Antisense- Desaturasenukleinsäuremoleküle.
- 25
- Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Modulation der Ausbeuten einer gewünschten Verbindung aus einer Zelle, umfassend das Einbringen eines Wildtyp- oder Mutanten-
- 30 Desaturasegens, das entweder auf einem separaten Plasmid gehalten oder in das Genom der Wirtszelle integriert wird, in eine Zelle. Bei Integration in das Genom kann die Integration zufallsgemäß sein oder durch derartige Rekombination erfolgen, dass das native Gen durch die eingebrachte Kopie ersetzt wird, wodurch die Produktion der gewünschten Verbindung durch die Zelle moduliert
- 35 wird, oder durch Verwendung eines Gens in trans, so dass das Gen mit einer funktionellen Expressionseinheit, welche mindestens eine die Expression eines Gens gewährleistende Sequenz und mindestens eine die Polyadenylierung eines funktionell transkribierten Gens gewährleistende Sequenz enthält, funktionell
- 40 verbunden ist.

- Bei einer bevorzugten Ausführungsform sind die Ausbeuten modifiziert. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die gewünschte Chemikalie vermehrt, wobei unerwünschte
- 45 störende Verbindungen vermindert werden können. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die gewünschte Feinchemikalie ein Lipid oder eine Fettsäure, ein Cofaktor oder ein

8

Enzym. Bei besonders bevorzugten Ausführungsform ist diese Chemikalie eine mehrfach ungesättigte Fettsäure. Stärker bevorzugt ist sie ausgewählt aus Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA) oder Docosahexaensäure (DHA).

5

Die vorliegende Erfindung stellt neue Nukleinsäuremoleküle bereit, die zur Identifizierung und Isolierung von Desaturasen der PUFA-Biosynthese geeignet sind und zur Modifikation von Ölen, Fettsäuren, Lipiden, von Lipiden stammenden Verbindungen und am

10 stärksten bevorzugt zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren verwendet werden können.

Ferner stellt die Erfindung Multiexpressionskassetten und Konstrukte zur multiparallelen samenspezifischen Expression

15 von Genkombinationen in Pflanzen zur Verfügung.

Mikroorganismen, wie *Cryptocodinium*, *Thraustochytrium*, *Phaeodactylum* und *Mortierella*, *Entomophthora*, *Mucor*, *Cryptocodinium* sowie andere Algen und Pilze und Pflanzen, insbesondere Ölfrucht-

20 pflanzen sind bevorzugte Organismen für das erfindungsgemäße Verfahren.

In WO 98/01572, oder in Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1(3):239-251, sowie Dunahay et al., 1995, Genetic

25 transformation of diatoms, J. Phycol. 31:10004-1012 und den Zitaten darin werden Klonierungsvektoren und Techniken zur genetischen Manipulation der obengenannten Mikroorganismen und Ciliaten, Algen oder verwandten Organismen, wie *Phaeodactylum tricorutum*, beschrieben. Dadurch können die oben genannten

30 Nukleinsäuremoleküle im erfindungsgemäßen Verfahren, indem die Organismen gentechnologisch verändert werden, verwendet werden, so dass sie bessere oder effizientere Produzenten einer oder mehrerer Feinchemikalien werden. Diese verbesserte Produktion oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie

35 kann durch eine direkte Wirkung der Manipulation eines erfindungsgemäßen Gens oder durch eine indirekte Wirkung dieser Manipulation hervorgerufen werden. Unter Feinchemikalien sind im Sinne der Erfindung Fettsäureester, die mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen enthalten wie

40 Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide, Phospholipide, Monoacylglyceride, Diacylglyceride, Triacylglyceride oder sonstige Fettsäureester, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen enthalten, zu verstehen. Weiter sind darunter zu verstehen Verbindungen wie

45 Vitamine beispielsweise Vitamin E, Vitamin C, Vitamin B₂, Vitamin B₆, Pantolacton, Carotinoide wie Astaxanthin, β -Carotin, Zeaxanthin und andere.

Moose und Algen sind die einzigen bekannten Pflanzensysteme, die erhebliche Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) herstellen. Moose enthalten PUFAs in

5 Membranlipiden während Algen, algenverwandte Organismen und einige Pilze auch nennenswerte Mengen an PUFAs in der Triacylglycerolfraktion akkumulieren. Daher eignen sich Nukleinsäuremoleküle, die aus solchen Stämmen isoliert werden, die PUFAs auch in der Triacylglycerolfraktion akkumulieren, besonders vorteil-

10 haft zur Modifikation des Lipid- und PUFA-Produktionssystems in einem Wirt, insbesondere in Mikroorganismen, wie den vorstehend erwähnten Mikroorganismen, und Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, beispielsweise Raps, Canola, Lein, Soja, Sonnenblumen, Borretsch. Sie sind deshalb vorteilhaft im erfindungsgemäßen Verfahren ver-

15 wendbar.

Weiterhin eignen sich deshalb die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren besonders vorteilhaft zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Triacylglycerol-akkumulierenden Mikroorganismen und zur

20 Identifikation solcher DNA-Sequenzen und den durch sie codierten Enzyme in anderen Arten, die sich zur Modifikation der Biosynthese von Vorläufermolekülen von PUFAs in den entsprechenden Organismen eignen.

25 Mikroorganismen wie *Cryptocodium cohnii*, *Thraustochytrium* und *Phaeodactylum*-Species sind Mikroorganismen, die PUFAs wie ARA, EPA oder DHA in Triacylglycerolen akkumulieren können. *Thraustochytrien* sind phylogenetisch auch eng verwandt mit *Schizochytrien* Stämmen. Die Fähigkeit, anhand der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren Desaturasen zu identifizieren, z.B. die Vorhersage der

30 Substratspezifität von Enzymen, kann daher von signifikanter Bedeutung sein. Ferner können diese Nukleinsäuremoleküle als Bezugssequenzen zur Kartierung verwandter Genome oder zur Ableitung von PCR-Primern dienen.

35 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle kodieren für Proteine, die als Desaturasen bezeichnet werden. Diese Desaturasen können beispielsweise eine Funktion ausüben, die am Stoffwechsel (z.B. an der Biosynthese oder am Abbau) von Verbindungen, die zur

40 Lipid- oder Fettsäuresynthese notwendig sind, wie PUFAs, beteiligt sind oder am Transmembrantransport einer oder mehrerer Lipid-/Fettsäureverbindungen entweder in die oder aus der Zelle teilnehmen.

45 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen codieren für Desaturasen, die zur Produktion langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren, vorzugsweise mit mehr als sechzehn,

10

achtzehn oder zwanzig Kohlenstoffatomen im Kohlenstoffgrundgerüst der Fettsäure und/oder mindestens zwei Doppelbindungen in der Kohlenstoffkette, geeignet sind, wobei eine erfindungsgemäße Nukleinsäure für ein Enzym codiert, das Doppelbindungen in die

5 Δ -5-Position, in einem anderen Fall in die Δ -6-Position und in einem weiteren Fall in die Δ -12-Position einführen kann. Mithilfe dieser Nukleinsäuren können hohe Mengen an PUFAs in der Triacylglycerolfraktion erhalten werden. Weiterhin wurden

10 Δ -4-Desaturase für ein Verfahren zur Produktion polyungesättigter Fettsäuren genutzt werden können. Dabei ist in der Anmeldung unter dem Singular d.h. unter einem Desaturasegen oder -Protein auch der Plural d.h. die Desaturasegenen oder -Proteinen zu verstehen.

15

Die Herstellung einer Triensäure mit C_{18} -Kohlenstoffkette mithilfe von Desaturasen konnte bisher gezeigt werden. In diesen literaturbekannten Verfahren wurde die Herstellung von γ -Linolensäure beansprucht. Bisher konnte jedoch niemand die Herstellung

20 sehr langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren (mit C_{20} - und längerer Kohlenstoffkette sowie von Triensäuren und höher ungesättigten Typen) allein durch modifizierte Organismen zeigen.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen langkettiger PUFAs müssen

25 die mehrfach ungesättigten C_{18} -Fettsäuren zunächst durch die enzymatische Aktivität einer Elongase um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert werden. Nach einer Elongationsrunde führt diese Enzymaktivität zu C_{20} -Fettsäuren, und nach zwei, drei und vier Elongationsrunden zu C_{22} -, C_{24} - oder C_{26} -Fettsäuren. Die in

30 dieser Erfindung offenbarten Nukleinsäuresequenzen, die für verschiedene Desaturasen codieren, können im Konzert mit Elongasen zu sehr langkettigen, polyungesättigten führen. Die Aktivität der erfindungsgemäßen Desaturasen führt vorzugsweise zu C_{18} -, C_{20} - und/oder C_{22} -Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im

35 Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt zu C_{18} - und/oder C_{20} -Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier oder fünf Doppelbindungen im Molekül. Die Fettsäureelongation kann durch Kombination der erfindungsge-

40 mäßen Desaturasen mit einer Elongaseaktivität erfolgen, wobei die durch die in SEQ ID NO: 9 codierte Elongase vorteilhaft verwendet werden kann. Nachdem die Verlängerung mit dem erfindungsgemäßen Enzym(en) stattgefunden hat, können weitere Desaturierungsschritte wie z.B. eine solche in Δ -5-Position erfolgen. Auch die

45 Kombination mit anderen Elongasen wie solche, die zu einer Verlängerung von C_{18} - auf C_{20} - oder von C_{20} - auf C_{22-24} Ketten wie in WO0012720 offenbart führt, kann Verwendung finden und/oder einer

Desaturase mit Aktivität für Δ -4-Position kann vorteilhaft eingesetzt werden, um die hoch desaturierten Fettsäuren zu erhalten. Daher führen die Produkte der Desaturaseaktivitäten und der möglichen weiteren Desaturierung zu bevorzugten PUFAs mit einem

5 höheren Desaturierungsgrad, wie Dihomo- γ -Linolensäure, Docosadiensäure, Arachidonsäure, ω 6-Eicosatriendihomo- γ -linolensäure, Eicosapentaensäure, ω 3-Eicosatriensäure, ω 3-Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure. Substrate der erfindungsgemäßen Enzymaktivität sind zum Beispiel Taxolsäure;

10 6,9-Octadecadiensäure, Linolsäure, Pinolensäure, α -oder γ -Linolensäure oder Stearidonsäure sowie Arachidonsäure, Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure, Eicosapentaensäure. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure, γ -Linolensäure und/oder α -Linolensäure sowie Arachidonsäure, Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure,

15 Eicosapentaensäure. Besonders bevorzugt als Produkte des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Arachidonsäure, Docosapentaensäure, Eicosapentaensäure. Die C_{18} -Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsgemäße enzymatische Aktivität in Form der freien Fettsäure oder

20 in Form der Ester, wie Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglyceride, Diacylglyceride oder Triacylglyceride, verlängert werden.

Für die menschliche Ernährung ist konjugierte Linolsäure "CLA"

25 von besonderer Bedeutung. Unter CLA versteht man insbesondere Fettsäuren wie $C_{18:2}$ ^{9 cis}, ^{11trans} oder das Isomer $C_{18:2}$ ^{10trans}, ^{12 cis}, die aufgrund menschlicher Enzymsysteme nach Aufnahme im Körper desaturiert bzw. elongiert werden können und zu gesundheitsfördernden Effekten beitragen können. Mit den erfindungsgemäßen

30 Desaturasen (Δ -12-Desaturase) können auch solche konjugierten Fettsäuren mit wenigstens zwei Doppelbindungen im Molekül desaturiert werden und damit solche gesundheitsfördernden Fettsäuren der menschlichen Ernährung zugeführt werden. Weitere Beispiel für konjugierte Fettsäuren sind alpha-Parinarensäure,

35 Punicasäure, Eleostearinsäure und Calendulasäure.

Unter der Verwendung von Klonierungsvektoren in Pflanzen und bei der Pflanzentransformation, wie denjenigen, die veröffentlicht sind in und dort zitiert sind: Plant Molecular Biology and

40 Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic

45 Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225), lassen

12

sich die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zur gentechnologischen Veränderung eines breiten Spektrums an Pflanzen verwenden, so dass diese ein besserer oder effizienterer Produzent eines oder mehrerer von Lipiden hergeleiteter Produkte, wie PUFAs, wird.

- 5 Diese verbesserte Produktion oder Effizienz der Produktion eines von Lipiden hergeleiteten Produktes, wie PUFAs, kann durch direkte Wirkung der Manipulation oder eine indirekte Wirkung dieser Manipulation hervorgerufen werden.
- 10 Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung eines erfindungsgemäßen Desaturaseproteins die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einer Ölfruchtpflanze oder einem Mikroorganismus aufgrund eines veränderten Proteins direkt beeinflussen kann.
- 15 Die Anzahl oder Aktivität des Desaturaseproteins oder -Gens sowie von Genkombinationen von Desaturasen und Elongasen kann erhöht sein, so dass größere Mengen dieser Verbindungen de novo hergestellt werden, weil den Organismen diese Aktivität und Fähigkeit zur Biosynthese vor dem Einbringen des ent-
- 20 sprechenden Gens fehlte. Entsprechendes gilt für die Kombination mit weiteren Desaturasen oder Elongasen oder weiteren Enzymen aus dem Lipidstoffwechsel. Auch die Verwendung verschiedener divergenter, d.h. auf DNA-Sequenzebene unterschiedlicher Sequenzen kann dabei vorteilhaft sein bzw. die Verwendung
- 25 von Promotoren zur Genexpression, die eine andere zeitliche Genexpression z.B. abhängig vom Reifegrad eines Samens oder Öl-speichernden Gewebes ermöglicht.

- Durch das Einbringen eines erfindungsgemäßen Desaturasegens
- 30 oder mehrerer Desaturasegene in einen Organismus allein oder in Kombination mit anderen Genen in eine Zelle kann nicht nur den Biosynthesefluss zum Endprodukt erhöhen, sondern auch die entsprechende Triacylglycerin-Zusammensetzung erhöhen oder de novo schaffen. Ebenso kann die Anzahl oder Aktivität anderer Gene,
- 35 die am Import von Nährstoffen, die zur Biosynthese einer oder mehrerer Feinchemikalien (z.B. Fettsäuren, polaren und neutralen Lipiden) nötig sind, erhöht sein, so dass die Konzentration dieser Vorläufer, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen innerhalb der Zellen oder innerhalb des Speicherkompartiments erhöht ist,
- 40 wodurch die Fähigkeit der Zellen zur Produktion von PUFAs, wie im folgenden beschrieben, weiter gesteigert wird. Fettsäuren und Lipide sind selbst als Feinchemikalien wünschenswert; durch Optimierung der Aktivität oder Erhöhung der Anzahl einer oder mehrerer Desaturasen, die an der Biosynthese dieser Verbindungen
- 45 beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität einer oder mehrerer Desaturasen, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder

Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Pflanzen oder Mikroorganismen zu steigern.

Die Mutagenese der/des erfindungsgemäßen Desaturasegene(s) kann
5 weiterhin zu einem Desaturaseprotein mit geänderten Aktivitäten
führen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter
Feinchemikalien direkt oder indirekt beeinflussen. Beispiels-
weise kann die Anzahl oder Aktivität der/des erfindungsgemäßen
Desaturasegens(e) gesteigert werden, so dass die normalen Stoff-
10 wechselabfälle oder -nebenprodukte der Zelle (deren Menge mög-
licherweise aufgrund der Überproduktion der gewünschten Fein-
chemikalie erhöht ist) effizient exportiert werden, bevor sie
andere Moleküle oder Prozesse innerhalb der Zelle (welche die
Lebensfähigkeit der Zelle senken würden) zerstören oder die Bio-
15 synthesewege der Feinchemikalie stören würden (wodurch die Aus-
beute, Produktion oder Effizienz der Produktion der gewünschten
Feinchemikalie verringert wird). Ferner können die relativ großen
intrazellulären Mengen der gewünschten Feinchemikalie selbst
toxisch für die Zelle sein oder Enzym-Rückkopplungsmechanismen,
20 wie die allosterische Regulation, stören, beispielsweise könnte
sie durch Steigerung der Aktivität oder Anzahl anderer strom-
abwärts folgender Enzyme oder Entgiftungsenzyme des PUFA-Wegs
die Allokation der PUFA in die Triacylglycerin-Fraktion steigern,
man könnte die Lebensfähigkeit von Saatzellen erhöhen, was
25 wiederum zu besserer Entwicklung von Zellen in Kultur oder zu
Saaten führt, die die gewünschte Feinchemikalie produzieren.
Das erfindungsgemäße Desaturasegen kann auch so manipuliert
werden, dass die entsprechenden Mengen der verschiedenen Lipid-
und Fettsäuremoleküle hergestellt werden. Dies kann eine ein-
30 schneidende Wirkung auf die Lipidzusammensetzung der Membran
der Zelle haben und erzeugt neue Öle zusätzlich zum Auftreten
neusynthetisierter PUFAs. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche
physikalische Eigenschaften hat, kann eine Veränderung der
Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität erheb-
35 lich verändern. Änderungen der Membranfluidität können sich
auf den Transport von Molekülen über die Membran sowie auf die
Unversehrtheit der Zelle auswirken, die beide eine entscheidende
Wirkung auf die Produktion von Feinchemikalien besitzen. In
Pflanzen können diese Änderungen überdies auch andere Merk-
40 male, wie Toleranz gegenüber abiotischen und biotischen Stress-
situationen, beeinflussen.

Biotische und abiotische Stresstoleranz ist ein allgemeines
Merkmal, das man an ein breites Spektrum von Pflanzen, wie
45 Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne,
Erdnuss, Baumwolle, Öl- und Faserlein, Raps und Canola, Lein,
Maniok, Pfeffer, Sonnenblume und Tagetes, Solanaceen-Pflanzen,

wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte, vererben möchte. Diese Feldfrüchte sind als weitere
5 erfindungsgemäße Ausführungsform auch bevorzugte Zielpflanzen für die Gentechnologie. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Sojabohne, Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Lein, Safflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) oder Feldfrüchte, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale,
10 Reis, Gerste, Alfalfa, oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee).

Folglich betrifft ein Aspekt der Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle (z.B. cDNAs), umfassend Nukleotidsequenzen, die eine Desaturase oder mehrere Desaturasen oder biologisch aktive
15 Teile davon codieren, oder Nukleinsäurefragmente, die sich als Primer oder Hybridisierungs sonden zum Nachweis oder zur Amplifikation desaturasekodierender Nukleinsäuren (z.B. DNA oder mRNA) eignen. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Nukleinsäuremolekül eine der in Sequenz ID NO:1 bzw 3 und 5 dar-
20 gestellten Nukleotidsequenzen oder die kodierende Region oder ein Komplement einer dieser Nukleotidsequenzen. Bei anderen besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die an eine Nukleotidsequenz, wie in der Sequenz SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11
25 dargestellt, oder einen Teil davon hybridisiert oder zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder
30 kodiert das isolierte Nukleinsäuremolekül eine der in der Sequenz SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 dargestellten Aminosäuresequenzen. Das bevorzugte erfindungsgemäße Desaturasegen besitzt vorzugsweise auch mindestens eine der hier beschriebenen Desaturaseaktivitäten.

35

Bei einer weiteren Ausführungsform kodiert das isolierte Nukleinsäuremolekül ein Protein oder einen Teil davon, wobei das Protein oder der Teil davon eine Aminosäuresequenz enthält, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz
40 SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ist, dass das Protein oder der Teil davon eine Desaturaseaktivität beibehält. Vorzugsweise behält das Protein oder der Teil davon, das/der von dem Nukleinsäuremolekül kodiert wird, die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen von Pflanzen notwendigen Verbindungen oder
45 am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen. Bei einer Ausführungsform ist das von dem Nukleinsäuremolekül kodierte Protein zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens

15

etwa 60 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Protein ein Volllängen-Protein, das im wesentlichen in Teilen homolog zu einer gesamten Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 (die von dem in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten offenen Leserahmen herrührt) ist.

10

Bei anderen Ausführungsformen umfasst die isolierte Desaturase eine Aminosäuresequenz, die zu mindestens etwa 50 % homolog zu einer der Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ist und am Stoffwechsel von zum Aufbau von Fettsäuren in einem Mikroorganismus oder einer Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann, wobei desaturierte C₁₈- oder C₂₀₋₂₂-Kohlenstoffketten mit Doppelbindungen an mindestens zwei Stellen gemeint ist.

- 20 Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform rührt das isolierte Nukleinsäuremolekül von *Phaeodactylum tricornutum* UTEX646 her und kodiert ein Protein (z.B. ein Desaturasefusionsprotein), das eine biologisch aktive Domäne enthält, die zu mindestens etwa 50 % oder mehr homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NR 2, 4, 6 oder 12 ist und die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen von Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen, beibehält oder zumindest eine der Desaturierungsaktivitäten resultierend in PUFAs wie GLA, ALA, Dihomo-gamma
- 25 Linolensäure, ARA, EPA oder DHA oder deren Vorläufermoleküle besitzt, und umfasst auch heterologe Nukleinsäuresequenzen, die ein heterologes Polypeptid oder regulatorische Proteine kodieren.

Alternativ kann die isolierte Desaturase eine Aminosäuresequenz umfassen, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 hybridisiert, z.B. unter stringenten Bedingungen hybridisiert, oder zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog dazu ist. Es ist ebenfalls bevorzugt, dass die bevorzugten Desaturaseformen ebenfalls eine der hier beschriebenen Desaturaseaktivitäten besitzen.

- 45 Bei einer anderen Ausführungsform ist das isolierte Nukleinsäuremolekül mindestens 15, 25, 50, 100, 250 oder mehr Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen an ein Nuklein-

säuremolekül, das eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 17 umfasst. Vorzugsweise entspricht das isolierte Nukleinsäuremolekül einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül. Stärker bevorzugt kodiert das isolierte Nukleinsäuremolekül
5 natürlich vorkommende Phaeodactylum-Desaturase oder einen biologisch aktiven Teil davon.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sind Expressionskassetten, die die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren
10 mit den Sequenzen SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 in den verschiedenen Organismen wie Mikroorganismen beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, Ciliaten, Algen oder tierische oder pflanzliche Zellen oder in Tieren oder Pflanzen ermöglichen.

15 Unter der erfindungsgemäßen Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt oder -fragment) sind die in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 genannten Sequenzen, die sich als Ergebnis des genetischen Codes und/oder deren funktionellen oder nicht funktionellen Derivate zu verstehen, die mit einem
20 oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden und welche die Expression der codierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst
25 nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression
30 der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und
35 die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche
40 Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht
45 werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression

17

der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die Δ -5-Desaturase-/ Δ -6-Desaturase und/oder Δ -12-Desaturasegene
5 können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten
10 Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem bei-
15 spielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, z.B. rekombinante Expressionsvektoren, die mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül enthalten, und Wirtszellen, in die
20 diese Vektoren eingebracht worden sind, insbesondere Mikroorganismen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe, -organe oder ganze Pflanzen. Bei einer Ausführungsform kann eine solche Wirtszelle Feinchemikalien-Verbindungen, insbesondere PUFAs, speichern; zur Isolation der gewünschten Verbindung werden die Zellen geerntet.
25 Die Verbindung (Öle, Lipide, Triacylglyceride, Fettsäuren) oder die Desaturase können dann aus dem Medium oder der Wirtszelle, welche bei Pflanzen Zellen sind, die Feinchemikalien enthalten oder speichern, am stärksten bevorzugt Zellen von Speicher-
geweben, wie Samenhüllen, Knollen, Epidermis- und Samenzellen,
30 Endosperm oder Embryogewebe isoliert werden.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine genetisch veränderte transgene Pflanze, bevorzugt ein Ölfruchtpflanze, wie vorstehend erwähnt, besonders bevorzugt eine Raps- oder Lein-
35 pflanze, in die ein Desaturasegen eingebracht worden ist. Bei einer Ausführungsform ist das Genom von Raps oder Lein durch Einbringen eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls, das eine Wildtyp- oder mutierte Desaturasesequenz kodiert, als Transgen verändert worden. Bei einer anderen Ausführungsform ist ein endo-
40 genes Desaturasegen im Genom des Spenderorganismus *Phaeodactylum* Mutagenese und Detektion mittels DNA-Sequenzen funktionell zerstört worden oder mittels Antisensetechnologie reprimiert worden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird Raps oder Lein auch zur Produktion einer gewünschten Verbindung, wie Lipiden und
45 Fettsäuren, wobei PUFAs besonders bevorzugt sind, verwendet.

18

Bei noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann das Moos *Physcomitrella patens* zur Demonstration der Funktion eines Desaturasesegens unter Verwendung homologer Rekombination auf der Basis der in dieser Erfindung beschriebenen Nukleinsäuren
5 verwendet werden.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein isoliertes Desaturasegen oder einen Teil, z.B. einen biologisch aktiven Teil, davon. Bei einer bevorzugten Ausführungsform kann die
10 isolierte Desaturase oder ein Teil davon am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in einem Mikroorganismus oder einer Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über dessen/deren Membranen teilnehmen. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die isolierte Desaturase
15 oder der Teil davon ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 das dieses Protein oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzenzellen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen
20 teilzunehmen, beibehält.

Die Erfindung stellt auch eine isolierte Präparation einer Desaturase in Form eines Rohextraktes oder als reines Protein bereit.

25

Das Desaturasepolypeptid oder ein biologisch aktiver Teil davon kann vorteilhaft funktionsfähig mit einem weiteren Polypeptid, das eine andere enzymatische Aktivität als die Desaturasen hat beispielsweise eine Elongase-, Acyltransferase- oder sonstige
30 Aktivität verbunden werden, so dass ein Fusionsprotein gebildet wird. Vorteilhaft hat dieses Fusionsprotein eine Aktivität, die sich von derjenigen der Desaturase allein unterscheidet. Bei anderen bevorzugten Ausführungsform nimmt dieses Fusionsprotein am Stoffwechsel von Verbindungen, die zur Synthese von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen in Mikroorganismen oder
35 Pflanzen notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teil. Besonders vorteilhaft moduliert das Einbringen dieses Fusionsproteins in einer Wirtszelle die Produktion einer gewünschten Verbindung innerhalb einer und durch die Zelle.
40 Bei einer bevorzugten Ausführungsform enthalten diese Fusionsproteine auch Δ -4-, Δ -5- oder Δ -6, Δ -8-, Δ -15, Δ -17 oder Δ -19-Desaturaseaktivitäten allein oder in Kombination. Insbesondere solche Genkombinationen sind bevorzugte Ausführungsformen, die aus SEQ ID NO: 7 oder 9 gewählt sind, bzw. Teilen
45 davon, Derivate oder ihren Homologen. Insbesondere solche Kombinationen sind bevorzugt, die die vollständige Proteinaktivität wie in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 enthalten und in

19

Multiexpressionskassetten definiert durch SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16 und 17 eingefügt zur Transformation von Pflanzen und Expression in Pflanzen geeignet sind.

5 Eingehende Beschreibung der Erfindung

Ein erfindungsgemäßer Gegenstand ist/sind isolierte Nukleinsäuresequenz(en), die für ein Polypeptid mit Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

10

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
- 15 b) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen erhalten werden,
- 20 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der
- 25 Polypeptide wesentlich reduziert ist.

Weiterhin betrifft die Erfindung eine Aminosäuresequenz, die durch die oben genannte(n) Nukleinsäuresequenz(en) codiert werden

30 (für die Erfindung soll der Singular den Plural und umgekehrt umfassen). Speziell betrifft die Erfindung Aminosäuresequenzen, die durch die in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellte Sequenz codiert werden.

35 Die vorliegende Erfindung stellt Nukleinsäuren und Proteinmoleküle mit Desaturaseaktivität bereit, die am Stoffwechsel von Lipiden und Fettsäuren, PUFA-Cofaktoren und Enzymen in dem Moos *Physcomitrella patens* oder am Transport lipophiler Verbindungen über Membranen beteiligt sind. Die erfindungsgemäßen Verbindungen

40 lassen sich zur Modulation der Produktion von Feinchemikalien aus Organismen, beispielsweise Mikroorganismen, wie Ciliaten, Pilzen, Hefen, Bakterien, Algen, und/oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuss, Baumwolle, Linum Arten wie Öl- oder Faserlein, Brassica-Arten,

45 wie Raps, Canola und Rübsen, Pfeffer, Sonnenblume, Borretsch, Nachtkerze und Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Maniok, Alfalfa,

Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernden Gräsern und Futterfeldfrüchten, entweder direkt (z.B. wenn die Überexpression oder Optimierung eines Fettsäurebiosynthese-Proteins einen direkten Einfluss auf die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Fettsäure aus modifizierten Organismen hat) verwenden oder können eine indirekt Auswirkung haben, die dennoch zu einer Steigerung der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung oder einer Abnahme unerwünschter Verbindungen führt (z.B. wenn die Modulation des Stoffwechsels von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen zu Veränderungen der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion oder der Zusammensetzung der gewünschten Verbindungen innerhalb der Zellen führt, was wiederum die Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien beeinflussen kann). Aspekte der Erfindung sind nachstehend weiter erläutert.

I. Feinchemikalien und PUFAs

Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und umfasst Moleküle, die durch einen Organismus produziert worden sind und Anwendungen in verschiedenen Industrien finden, wie, aber nicht beschränkt auf, die pharmazeutische, Landwirtschafts-, Nahrungsmittel- und Kosmetik-Industrie. Diese Verbindungen umfassen Lipide, Fettsäuren, Cofaktoren und Enzyme usw. (wie z.B. beschrieben in Kunitake, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsgb., VCH: Weinheim und darin enthaltenen Literaturstellen), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (z.B. Arachidonsäure), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, Vitamins, S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und darin enthaltenen Literaturstellen; und Ong, A.S., Niki, E., & Packer, L. (1995) Nutrition, Lipids, Health and Disease Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCs Press (1995)), Enzyme und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086, und darin angegebenen Literaturstellen beschriebenen Chemikalien. Der Stoffwechsel und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

Die Kombination verschiedener Vorläufermoleküle und Biosynthesenzyme führt zur Herstellung verschiedener Fettsäuremoleküle, was eine entscheidende Auswirkung auf die Zusammensetzung der Membran

hat. Es kann angenommen werden, dass PUFAs nicht nur einfach in Triacylglycerin, sondern auch in Membranlipide eingebaut werden.

Die Synthese von Membranen ist ein gut charakterisierter Prozess, an dem eine Anzahl von Komponenten, einschließlich Lipiden als Teil der Bilayer-Membran, beteiligt sind. Die Produktion neuer Fettsäuren, wie PUFAs, kann daher neue Eigenschaften von Membranfunktionen innerhalb einer Zelle oder eines Organismus erzeugen.

10 Zellmembranen dienen einer Vielzahl von Funktionen in einer Zelle. Zuerst und in erster Linie grenzt eine Membran den Inhalt einer Zelle von der Umgebung ab, wodurch sie der Zelle Integrität verleiht. Membranen können auch als Schranken gegenüber dem Einstrom gefährlicher oder unerwünschter Verbindungen und auch
15 gegenüber dem Ausstrom gewünschter Verbindungen dienen.

Detailliertere Beschreibungen und Beteiligungen von Membranen und die beteiligten Mechanismen siehe in: Bamberg, E., et al. (1993) Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes,
20 Q. Rev. Biophys. 26:1-25; Gennis, R.B. (1989) Pores, Channels and Transporters, in: Biomembranes, Molecular Structure and Function, Springer: Heidelberg, S. 270-322; und Nikaido, H., und Saier, H. (1992) Transport proteins in bacteria: common themes in their design, *Science* 258:936-942, und den in jeder
25 dieser Literaturstellen enthaltenen Zitaten.

Die Lipidsynthese lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die Synthese von Fettsäuren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-Phosphat sowie die Addition oder Modifikation einer polaren
30 Kopfgruppe. Übliche Lipide, die in Membranen verwendet werden, umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase oder in Acetyl-ACP durch die Acetyltransacylase. Nach einer
35 Kondensationsreaktion bilden diese beiden Produktmoleküle zusammen Acetoacetyl-ACP, das über eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen umgewandelt wird, so dass ein gesättigtes Fettsäuremolekül mit der gewünschten Kettenlänge erhalten wird. Die Produktion der ungesättigten Fettsäuren
40 aus diesen Molekülen wird durch spezifische Desaturasen katalysiert, und zwar entweder aerob mittels molekularem Sauerstoff oder anaerob (bezüglich der Fettsäuresynthese in Mikroorganismen siehe F.C. Neidhardt et al. (1996) *E. coli* und *Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C., S. 612-636 und darin enthaltene
45 Literaturstellen; Lengeler et al. (Hrsgb.) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York, und die enthaltene Literaturstellen, sowie Magnuson, K., et al. (1993) *Micro-*

biological Reviews 57:522-542 und die enthaltenen Literaturstellen).

- Vorläufer für die PUFA-Biosynthese sind beispielsweise Ölsäure, 5 Linol- und Linolensäure. Diese C₁₈-Kohlenstoff-Fettsäuren müssen auf C₂₀ und C₂₂ verlängert werden, damit Fettsäuren vom Eicosa- und Docosa-Kettentyp erhalten werden. Mithilfe verschiedener Desaturasen, wie Enzymen, welche Δ-12-Desaturase, Δ-15-Desaturase, Δ-6-Desaturase-, Δ-5- und Δ-4-Desaturase- 10 aktivität aufweisen, können Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure sowie verschiedene andere langkettige PUFAs erhalten, extrahiert und für verschiedene Zwecke bei Nahrungs- mittel-, Futter-, Kosmetik- oder pharmazeutischen Anwendungen verwendet werden.
- 15 Zur Herstellung langkettiger PUFAs müssen, wie oben erwähnt, die mehrfach ungesättigten C₁₈- bzw C₂₀-Fettsäuren mehrfach desaturiert werden. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen kodieren erste funktionell aktive Desaturasen aus *Phyeodactylum* 20 *tricornutum*, einem Mikroorganismus, der PUFAs in der Triacyl- glycerolfraktion enthält. Mit den erfindungsgemäßen Desaturasen können Doppelbindungen in die Δ-5-, Δ-6- oder Δ-12-Position ein- geführt werden. Die Aktivitäten der erfindungsgemäßen Desaturasen führt vorzugsweise zu C₁₈- + C₂₀-Fettsäuren mit mindestens zwei, 25 drei, vier oder fünf Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vor- zugsweise zu C₂₀-Fettsäuren mit vorteilhaft drei, vier oder fünf Doppelbindungen im Fettsäuremolekül. Die Desaturierung kann vor oder nach Elongation der entsprechenden Fettsäure erfolgen. Daher führen die Produkte der Desaturaseaktivitäten und der mög- 30 lichen weiteren Desaturierung und Elongation zu bevorzugten PUFAs mit höherem Desaturierungsgrad, einschließlich einer weiteren Elongation von C₂₀ zu C₂₂-Fettsäuren, zu Fettsäuren wie Linolsäure, Docosadiensäure, dihomο-γ-linolensäure, Arachidonsäure, ω6-Eicosa- triendihomο-γ-linolensäure, Eicosapentaensäure, ω3-Eicosatrien- 35 säure, ω3-Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure oder Docosa- hexaensäure. Substrate dieser erfindungsgemäßen Enzymaktivität sind zum Beispiel Taxolsäure, 6,9-Octadecadiensäure, Ölsäure, Linolsäure, γ-Linolensäure, Pinolensäure, α-Linolensäure, Ara- chidonsäure, Eicosapentaensäure oder Stearidonsäure. Bevorzugte 40 Substrate sind Linolsäure, γ-Linolensäure und/oder α-Linolensäure, dihomο-γ-linolensäure bzw. Arachidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Die C₁₈-oder C₂₀-Fettsäuren mit min- destens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsgemäße Enzymaktivität in Form der freien Fettsäure oder 45 in Form der Ester, wie Phospholipide, Glykolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglyceride, Diacylglyceride, Triacylgly- ceride oder sonstige Ester, verlängert werden.

Ferner müssen Fettsäuren anschließend an verschiedene Modifikationsorte transportiert und in das Triacylglycerin-Speicherlipid eingebaut werden. Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die polaren Kopfgruppen, beispielsweise durch Glycerin-Fettsäure-Acyltransferase (siehe Frentzen, 1998, Lipid, 100(4-5):161-166).

Veröffentlichungen über die Pflanzen-Fettsäurebiosynthese, Desaturierung, den Lipidstoffwechsel und Membrantransport von fetthaltigen Verbindungen, die Betaoxidation, Fettsäuremodifikation und Cofaktoren, Triacylglycerin-Speicherung und -Assemblierung einschließlich der Literaturstellen darin siehe in den folgenden Artikeln: Kinney, 1997, Genetic Engineering, Hrsgb.: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge und Browse, 1995, Plant Cell 7:957-970; Shanklin und Cahoon, 1998, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:611-641; Voelker, 1996, Genetic Engineering, Hrsgb.: JK Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, Prog. Lipid R. 31:397-417; Gühnemann-Schäfer & Kindl, 1995, Biochim. Biophys Acta 1256:181-186; Kunau et al., 1995, Prog. Lipid Res. 34:267-342; Stymne et al., 1993, in: Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants, Hrsgb.: Murata und Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, Plant Journal. 13(1):1-16.

25

Vitamine, Cofaktoren und Nutraceutical wie PUFAs, umfassen eine Gruppe von Molekülen, die höhere Tiere nicht mehr synthetisieren können und somit aufnehmen müssen oder die höhere Tiere nicht mehr ausreichend selbst herstellen können und somit zusätzlich aufnehmen müssen, obwohl sie leicht von anderen Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden. Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die sie produzieren können, wie in Bakterien, ist im großen und ganzen charakterisiert worden (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996; Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E., & Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research Asia, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 S).

Die oben erwähnten Moleküle sind entweder selbst biologisch aktive Moleküle oder Vorstufen biologisch aktiver Substanzen, die entweder als Elektronenüberträger oder Zwischenprodukte bei einer Vielzahl von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben

neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert als Farbstoffe, Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Verarbeitungshilfsstoffe. (Einen Überblick über Struktur, Aktivität und industrielle Anwendungen dieser Verbindungen siehe z.B.

- 5 in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren haben verschiedene Funktionen und gesundheitsfördernde Wirkungen, beispielsweise bei koronarer Herzerkrankung, Entzündungsmechanismen, Kinderernährung usw. Veröffentlichungen
10 und Literaturstellen, einschließlich darin zitierter Literaturstellen, siehe in: Simopoulos, 1999, Am. J. Clin. Nutr. 70 (3. Suppl.):560-569, Takahata et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 1998, 62(11):2079-2085, Willich und Winther, 1995, Deutsche Medizinische Wochenschrift 120(7):229ff.

15

II. Elemente und Verfahren der Erfindung

Die vorliegende Erfindung beruht unter anderem auf der Entdeckung neuer Moleküle, die hier als Desaturasenukleinsäure- und

- 20 -proteinmoleküle bezeichnet werden, welche eine Wirkung auf die Produktion von Zellmembranen und Lipiden Phaeodactylum tri-cornutum ausüben und beispielsweise die Bewegung von Molekülen über diese Membranen beeinflussen. Bei einer Ausführungsform nehmen die Desaturasemoleküle am Stoffwechsel von zum Aufbau von
25 Zellmembranen in Organismen, wie Mikroorganismen und Pflanzen, notwendigen Verbindungen teil oder beeinflussen indirekt den Transport von Molekülen über diese Membranen. Bei einer bevorzugten Ausführungsform hat die Aktivität der erfindungsgemäßen Desaturasemoleküle zur Regulation der Produktion von Membran-
30 komponenten und des Membrantransports eine Auswirkung auf die Produktion der gewünschten Feinchemikalie durch diesen Organismus. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Aktivität der erfindungsgemäßen Desaturasemoleküle moduliert, so dass die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz
35 der Produktion der Stoffwechselwege von Mikroorganismen oder Pflanzen, welche die erfindungsgemäßen Desaturasen regulieren, moduliert sind und die Effizienz des Transport von Verbindungen durch die Membranen verändert ist, was entweder direkt oder indirekt die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der
40 Produktion einer gewünschten Feinchemikalie durch Mikroorganismen und Pflanzen moduliert.

Der Begriff "Desaturase" oder "Desaturasepolypeptid" umfasst Proteine, die an der Desaturierung von Fettsäuren teilnehmen.

- 45 Beispiele für Desaturasen sind in der SEQ ID NO: 1, 3, 5, 11 oder ihren Homologen, Derivaten oder Analoga offenbart. Die Begriffe Desaturase oder Desaturasenukleinsäuresequenz(en)

umfassen Nukleinsäuresequenzen, die eine Desaturase kodieren und bei denen ein Teil eine kodierende Region und ebenfalls entsprechende 5'- und 3'-untranslatierte Sequenzbereiche sein können. Beispiele für Desaturase-Gene sind die in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 dargestellten. Die Begriffe Produktion oder Produktivität sind im Fachgebiet bekannt und beinhalten die Konzentration des Fermentationsproduktes (zum Beispiel der gewünschten Feinchemikalie), das in einer bestimmten Zeitspanne und einem bestimmten Fermentationsvolumen gebildet wird (z.B. 5 kg Produkt pro Stunde pro Liter). Der Begriff Effizienz der Produktion umfasst die Zeit, die zur Erzielung einer bestimmten Produktionsmenge nötig ist (z.B. wie lange die Zelle zur Auf- 10 richtung einer bestimmten Durchsatzrate einer Feinchemikalie benötigt). Der Begriff Ausbeute oder Produkt/Kohlenstoff- Ausbeute ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Effizienz der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das Produkt (d.h. die Feinchemikalie). Dies wird gewöhnlich beispielsweise ausgedrückt als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle. Durch Erhöhen der 15 Ausbeute oder Produktion der Verbindung wird die Menge der gewonnenen Moleküle oder der geeigneten gewonnenen Moleküle dieser Verbindung in einer bestimmten Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht. Die Begriffe Biosynthese oder Biosyntheseweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Ver- 20 bindung, durch eine Zelle aus Zwischenverbindungen, beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Die Begriffe Abbau oder Abbauweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle in Abbauprodukte 25 (allgemeiner gesagt, kleinere oder weniger komplexe Moleküle) beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Der Begriff Stoffwechsel ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Stoffwechsel einer bestimmten 30 Verbindung (z.B. der Stoffwechsel einer Fettsäure) umfasst dann die Gesamtheit der Biosynthese-, Modifikations- und Abbauwege dieser Verbindung in der Zelle, die diese Verbindung betreffen. 35

Bei einer anderen Ausführungsform können die erfindungsgemäßen 40 Nukleinsäuresequenzen, die für Desaturase-Moleküle codieren, die Produktion eines gewünschten Moleküls, wie einer Feinchemikalie, in einem Mikroorganismus oder in Pflanzen modulieren. Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung einer erfindungsgemäßen Sequenz die Ausbeute, Produktion und/oder 45 Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einem Mikroorganismus- oder Pflanzenstamm, die dieses veränderte Protein enthalten, direkt beeinflussen kann. Die Anzahl oder Aktivität

26

von Desaturasen, die am Transport von Feinchemikalienmolekülen innerhalb oder aus der Zelle beteiligt sind, kann erhöht werden, so dass größere Mengen dieser Verbindungen über Membranen transportiert werden, aus denen sie leichter gewonnen und ineinander
5 umgewandelt werden. Ferner sind Fettsäuren, Triacylglycerine und/oder Lipide selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch Optimierung der Aktivität oder Steigern der Anzahl einer oder mehrerer erfindungsgemäßer Desaturasen, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Stören der Aktivität einer oder mehrerer Desaturasen, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Organismen, wie Mikroorganismen oder Pflanzen, zu erhöhen.

15

Die Mutagenese des erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen kann Desaturasen mit veränderten Aktivitäten hervorbringen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter Feinchemikalien aus Mikroorganismen oder Pflanzen indirekt beeinflussen. Beispielsweise können erfindungsgemäße Desaturasen, die am Export von Abfallprodukten beteiligt sind, eine größere Anzahl oder höhere Aktivität aufweisen, so dass die normalen Stoffwechselabfälle der Zelle (deren Menge möglicherweise aufgrund der Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie erhöht ist) effizient exportiert
20 werden, bevor sie die Moleküle in der Zelle schädigen können (was die Lebensfähigkeit der Zelle herabsetzen würde) oder die Feinchemikalien-Biosynthesewege stören können (was die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie senken würde). Die relativ großen intrazellulären
30 Mengen der gewünschten Feinchemikalie selbst können ferner für die Zelle toxisch sein, so dass man durch Steigern der Aktivität oder Anzahl von Transportern, die diese Verbindungen aus der Zelle exportieren können, die Lebensfähigkeit der Zelle in Kultur steigern kann, was wiederum zu einer größeren Anzahl an Zellen
35 in der Kultur führt, welche die gewünschte Feinchemikalie produzieren. Die erfindungsgemäßen Desaturasen können auch so manipuliert werden, dass die entsprechenden Mengen unterschiedlicher Lipid- und Fettsäuremoleküle produziert werden. Dies kann eine erhebliche Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften aufweist, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport von Molekülen über die Membran sowie die Integrität der Zelle
40 beeinflussen, was jeweils eine erhebliche Auswirkung auf die Produktion von Feinchemikalien aus Mikroorganismen und Pflanzen in Fermentationskultur im großen Maßstab hat. Pflanzenmembranen

verleihen spezifische Eigenschaften, wie Toleranz gegenüber Wärme, Kälte, Salz, Trockenheit sowie Toleranz gegen Pathogene, wie Bakterien und Pilze. Daher kann die Modulation der Membrankomponenten eine grundlegende Wirkung auf die Überlebensfähigkeit der Pflanzen unter den oben genannten Stressparametern haben. Dies kann über Änderungen in Signalkaskaden oder direkt über die veränderte Membranzusammensetzung erfolgen (siehe zum Beispiel: Chapman, 1998, Trends in Plant Science, 3(11):419-426) und Signalkaskaden (siehe Wang 1999, Plant Physiology, 120:645-651) oder die Kältetoleranz, wie offenbart in WO 95/18222, beeinflussen.

Die erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuresequenzen sind im Genom eines *Phaeodactylum tricornutum* UTEX646-Stammes enthalten, der über die Algensammlung der University of Texas, Austin verfügbar ist.

Die Nukleotidsequenz der *Phaeodactylum tricornutum*-cDNA und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Desaturasen sind in den SEQ ID NO: 1 bis 6 sowie 11 und 12 gezeigt. Es wurden Computeralysen durchgeführt, die diese Nukleotidsequenzen als Sequenzen klassifizieren und/oder identifizieren, die am Stoffwechsel von Zellmembrankomponenten beteiligte Proteine oder am Transport von Verbindungen über Zellmembranen beteiligte Proteine bzw. der PUFA Biosynthese codieren. EST's mit der Datenbankeingabe-NO: PT001070010R und PT001078032R durch die Erfinder stellen die erfindungsgemäßen Sequenzen in SEQ ID NO: 1 und 3 dar. Die Sequenz des Fragments aus EST PT001070010R wurde ermittelt und ist wie dargestellt in SEQ ID NO: 5. Analog ist die Sequenz des Klonen PT001078032R dargestellt in SEQ ID NO: 1. Den Klonen wurden Genamen zugewiesen. Abkürzungen bedeuten: Pp = *Physcomitrella patens*, Pt = *Phaeodactylum tricornutum*. PT001070010R aus SEQ ID NO: 5 codiert für ein neues Gen homolog zu Δ -12-Desaturase und PT001078032R codiert für eine neuartige Δ -5-Desaturase. Pt_des6 kann gemäß Beispiel 5a mittels Polymerase Kettenreaktion unter Zuhilfenahme degenerierter Oligonukleotide isoliert werden. Ein so erhaltenes Fragment kann zum Sichten einer cDNA Bank aus *Phaeodactylum tricornutum* isoliert werden und die codierende Region einer *Phaeodactylum tricornutum* Δ -6-Desaturase erhalten werden. Ein so isoliertes Gen wird in Tabelle 1 als Pt_des6 bezeichnet und ist in SEQ ID NO: 3 dargestellt. Die korrespondierenden Aminosäuresequenzen werden durch Übersetzung des genetischen Codes der Sequenz ID NO: 1, 3 und 5 erhalten und sind als SEQ ID NO: 2, 4 und 6 definiert (siehe auch Tabelle 1). Auch eine weitere Nukleinsäuresequenz, die für eine Δ -12-Desaturase codiert,

28

ist Tabelle 1 zu entnehmen. Sie trägt die Klon-Nummer PT001072031R.

Tabelle 1

5

10

	Gername	Klonname	Nukleinsäure SEQ ID NO:	Polypeptid SEQ ID NO:
D5 Desaturase	Pt_des5	PT001078032R	1	2
D6 Desaturase	Pt_des6	Pt_des6	3	4
D12 Desaturase	Pt_des12	PT001070010R	5	6
D6 Desaturase	Pp_des6	Pp_des6	7	8
D6 Elongase	Pp_PSE1	PP001019019F	9	10
Δ12 Desaturase	Pt des12.2	PT001072013R	11	12

- 15 Die vorliegende Erfindung betrifft auch Proteine mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2, 4, 6 oder 12 ist. Wie hier verwendet, ist ein Protein mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz ist, zu mindestens etwa 50 % homolog zu der ausgewählten Aminosäuresequenz, z.B. der gesamten ausgewählten Aminosäuresequenz. Ein Protein mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz ist, kann auch zu mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 % oder 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz sein.
- 30 Die erfindungsgemäße Desaturase oder der biologisch aktive Teil oder das Fragment davon kann am Stoffwechsel von Lipiden zum Aufbau von Zellmembranen oder Speicherlipiden in Mikroorganismen teilnehmen und in Kombination mit weiteren Genen, insbesondere solchen mit Elongaseaktivität zur Elongation von C₁₈-bzw C₂₀-22-PUFAs benötigten Aktivitäten beitragen, so dass C₁₈, C₂₀-, C₂₂- oder C₂₄-PUFAs sowie verwandte PUFAs erhalten werden. Dabei können erfindungsgemäße Desaturasen in Kombination mit Elongasen und anderen Desaturasen in erfindungsgemäßen Expressionskassetten kloniert werden und zur Transformation von Pflanzen mithilfe von Agrobakterium eingesetzt werden.

Verschiedene Aspekte der Erfindung sind eingehender in den folgenden Unterabschnitten beschrieben.

45

29

A. Isolierte Nukleinsäuremoleküle

Eine Ausführungsform der Erfindung sind isolierte Nukleinsäuren, die von PUFA produzierenden Mikroorganismen stammen und für Poly-
5 peptide kodieren, die C₁₈-oder C₂₀₋₂₂-Fettsäuren mit mindestens einer, zwei, drei oder vier Doppelbindungen in der Fettsäure desaturieren.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform sind isolierte
10 Nukleinsäuren, umfassend Nukleotidsequenzen, die für Polypeptide kodieren, die C₁₈-bzw C₂₀-Fettsäuren mit mindestens ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen in der Fettsäure desaturieren und sind aus der Gruppe, bestehend aus

- 15 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
- 20 b) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen erhalten werden,
- 25 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne dass die enzymatische Wirkung
30 der Polypeptide wesentlich reduziert ist.

Die oben genannte erfindungsgemäße Nukleinsäure stammt von Organismen, wie Ciliaten, Pilzen, Algen oder Dinoflagellaten, die PUFAs synthetisieren können, vorzugsweise von Phaeodactylum
35 tricornutum oder nah verwandten Organismen.

Ein Aspekt der Erfindung betrifft isolierte Nukleinsäuremoleküle, die Desaturase-Polypeptide oder biologisch aktive Teile davon kodieren, sowie Nukleinsäurefragmente, die zur Verwendung
40 als Hybridisierungssonden oder Primer zur Identifizierung oder Amplifizierung einer Desaturase-kodierenden Nukleinsäure (z.B. Desaturase-DNA) ausreichen. Der Begriff "Nukleinsäuremolekül", wie hier verwendet, soll DNA-Moleküle (z.B. cDNA oder genomische DNA) und RNA-Moleküle (z.B. mRNA) sowie DNA- oder RNA-Analoga,
45 die mittels Nukleotidanaloga erzeugt werden, umfassen. Dieser Begriff umfasst zudem die am 3'- und am 5'-Ende des kodierenden Genbereichs gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens 500,

30

- bevorzugt 200, besonders bevorzugt 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des kodierenden Bereichs und mindestens 100, bevorzugt 50, besonders bevorzugt 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes des kodierenden Genbereichs.
- 5 Das Nukleinsäuremolekül kann einzelsträngig oder doppelsträngig sein, ist aber vorzugsweise doppelsträngige DNA. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure vorliegen. Eine "isolierte" Nukleinsäure hat vorzugsweise keine Sequenzen,
- 10 welche die Nukleinsäure in der genomischen DNA des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, natürlicherweise flankieren (z.B. Sequenzen, die sich an den 5'- und 3'-Enden der Nukleinsäure befinden). Bei verschiedenen Ausführungsformen kann das isolierte Desaturase-Nukleinsäuremolekül zum Beispiel weniger
- 15 als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb an Nukleotidsequenzen enthalten, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt (z.B. eine *Physcomitrella patens*-Zelle) flankieren. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül, wie ein cDNA-
- 20 Molekül, kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.
- 25 Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, z.B. ein Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 oder eines Teils davon, kann unter Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken und der hier bereitgestellten Sequenz-
- 30 information isoliert werden. Auch kann mithilfe von Vergleichsalgorithmen beispielsweise eine homologe Sequenz oder homologe, konservierte Sequenzbereiche auf DNA oder Aminosäureebene identifiziert werden. Beispielsweise kann aus einer *Phaeodactylum tricorutum* cDNA aus einer *Phaeodactylum tricorutum*-Bank iso-
- 35 liert werden, indem die vollständige SEQ ID NO:1, 3, 5 oder 11 oder ein Teil davon als Hybridisierungssonde sowie Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press,
- 40 Cold Spring Harbor, NY, 1989) verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz oder von Teilen davon, insbesondere
- 45 Regionen um Motive aus Beispiel 5a erstellt werden oder Modifikationen ebensolcher in einzelnen definierten Aminosäuren, verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend die

31

- vollständigen Sequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Oligonukleotidprimern isoliert werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 erstellt worden sind). Zum Beispiel lässt sich mRNA aus Zellen isolieren (z.B. durch das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) Biochemistry 18:5294-5299) und cDNA mittels Reverser Transkriptase (z.B. Moloney-MLV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL) herstellen. Synthetische Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion lassen sich auf der Basis einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 sowie der in Figur 5a gezeigten Sequenzen oder mithilfe der in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 dargestellten Aminosäuresequenzen erstellen. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann unter Verwendung von cDNA oder alternativ von genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß Standard-PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer Desaturase-Nukleotidsequenz entsprechen, können durch Standard-Syntheseverfahren, beispielsweise mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.
- Die in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigte cDNA umfasst Sequenzen, die Desaturasen kodieren, (d.h. den "kodierenden Bereich") sowie 5'-untranslatierte Sequenzen und 3'-untranslatierte Sequenzen. Alternativ kann das Nukleinsäuremolekül nur den kodierenden Bereich einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 umfassen oder kann ganze genomische Fragmente, die aus genomischer DNA isoliert sind, enthalten.

- Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül ein Nukleinsäuremolekül, das ein Komplement einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen oder eines Teils davon ist. Ein Nukleinsäuremolekül, das zu einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen komplementär ist, ist dann ausreichend komplementär, wenn es mit einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 angegebenen Sequenzen hybridisieren kann, wodurch ein stabiler Duplex entsteht.

- Homologe der neuen Desaturase-Nukleinsäuresequenzen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 bedeutet beispielsweise allelische Varianten mit mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 %, stärker bevorzugt mindestens

32

etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 % oder 90 bis 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Homologie zu einer in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen oder ihren Homologen, Derivaten oder Analoga
5 oder Teilen davon. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst ein isoliertes erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die an eine der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen oder einen Teil davon hybridisiert, z.B. unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Allelische
10 Varianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus/in der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 dargestellten Sequenz erhalten lassen, wobei aber die Absicht ist, dass die Enzymaktivität der davon herrührenden synthetisierten Proteine für
15 die Insertion eines oder mehrerer Gene vorteilhafterweise beibehalten wird. Proteine, die noch die enzymatische Aktivität der Desaturase besitzen, das heißt deren Aktivität im wesentlichen nicht reduziert ist, bedeutet Proteine mit mindestens 10 %, vorzugsweise 20 %, besonders bevorzugt 30 %, ganz besonders bevorzugt 40 % der ursprünglichen Enzymaktivität, verglichen mit dem
20 durch SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 kodierten Protein.

Homologen der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 bedeuten beispielsweise auch bakterielle, Pilz- und Pflanzenhomologen, verkürzte
25 Sequenzen, einzelsträngige DNA oder RNA der kodierenden und nicht-kodierenden DNA-Sequenz.

Homologen der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 bedeutet auch Derivate, wie beispielsweise Promotorvarianten. Die Promotoren
30 stromaufwärts der angegebenen Nukleotidsequenzen können durch einen oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) modifiziert werden, ohne dass jedoch die Funktionalität oder Aktivität der Promotoren gestört wird. Es ist weiterhin möglich, dass die Aktivität der Promotoren durch
35 Modifikation ihrer Sequenz erhöht ist oder dass sie vollständig durch aktivere Promotoren, sogar aus heterologen Organismen, ersetzt werden.

Überdies kann das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül nur
40 einen Teil des kodierenden Bereichs einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 umfassen, zum Beispiel ein Fragment, das als Sonde oder Primer verwendet werden kann, oder ein Fragment, welches einen biologisch aktiven Abschnitt einer Desaturase kodiert. Die aus der Klonierung des Desaturase-Gens
45 von *Phaeodactylum tricornutum* ermittelten Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von Desaturase-Homologen in anderen

33

Zelltypen und Organismen sowie Desaturase-Homologen aus anderen Mikroalgen oder verwandten Arten gestaltet sind. Die Sonde/der Primer umfasst gewöhnlich im wesentlichen gereinigtes Oligonukleotid. Das Oligonukleotid umfasst gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringenten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise etwa 16, stärker bevorzugt etwa 25, 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 angegebenen Sequenzen, eines Antisense-Stranges einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 angegebenen Sequenzen oder seiner Homologen, Derivate oder Analoga oder natürlich vorkommender Mutanten davon hybridisiert. Primer auf der Basis einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 können in PCR-Reaktionen zur Klonierung von Desaturase-Homologen verwendet werden. Sonden auf der Basis der Desaturase-Nukleotidsequenzen können zum Nachweis von Transkripten oder genomischen Sequenzen, die das gleiche oder homologe Proteine kodieren, verwendet werden. Bei bevorzugten Ausführungsformen umfasst die Sonde zudem eine daran gebundene Markierungsgruppe, z.B. ein Radioisotop, eine fluoreszierende Verbindung, ein Enzym oder einen Enzym-Cofaktor. Diese Sonden können als Teil eines Test-Kits für genomische Marker zur Identifizierung von Zellen, die eine Desaturase misexprimieren, beispielsweise durch Messen einer Menge einer Desaturase-kodierenden Nukleinsäure in einer Zellenprobe, z.B. Messen der Desaturase-mRNA-Spiegel, oder zur Bestimmung, ob ein genomisches Desaturase-Gen mutiert oder deletiert ist, verwendet werden.

Bei einer Ausführungsform kodiert das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ein Protein oder einen Teil davon, das/der eine Aminosäuresequenz umfasst, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ist, dass das Protein oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen, beibehält. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "ausreichend homolog" Proteine oder Teile davon, deren Aminosäuresequenzen eine minimale Anzahl identischer oder äquivalenter Aminosäurereste (z.B. einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette, wie ein Aminosäurerest in einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 2) zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2 aufweisen, so dass das Protein oder der Teil davon am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann. Proteinbestandteile dieser Stoffwechselwege für Membrankomponenten oder Membrantransportsysteme können, wie hier beschrieben, eine Rolle bei der Produktion und Sekretion einer oder mehrerer

34

Feinchemikalien spielen. Beispiele für diese Aktivitäten sind hier ebenfalls beschrieben. Somit trägt die "Funktion einer Desaturase" entweder direkt oder indirekt zur Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien bei. Beispiele für Desaturase-Substratspezifitäten der katalytischen Aktivität sind in Tabelle 5 und 6 angegeben.

- Bei einer weiteren Ausführungsform kodieren Derivate des
- 10 erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls Proteine mit mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Homologie zu einer vollständigen
- 15 Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2. Die Homologie der Aminosäuresequenz kann über den gesamten Sequenzbereich mit dem Programm PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5, 1989:151-153) oder BESTFIT oder GAP bestimmt (Henikoff, S. and Henikoff, J. G. (1992). Amino acid substitution
- 20 matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919.)

- Teile von Proteinen, die von den erfindungsgemäßen Desaturase-Nukleinsäuremolekülen kodiert werden, sind vorzugsweise bio-
- 25 logisch aktive Teile einer der Desaturasen. Wie hier verwendet, soll der Begriff "biologisch aktiver Teil einer Desaturase", einen Abschnitt, z.B. eine Domäne/ein Motiv, einer Desaturase umfassen, der am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder
- 30 am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann oder eine in Tabelle 5 und 6 angegebene Aktivität aufweist. Zur Bestimmung, ob eine Desaturase oder ein biologisch aktiver Teil davon am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Trans-
- 35 port von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann, kann ein Test der enzymatischen Aktivität durchgeführt werden. Diese Testverfahren, wie eingehend in Beispiel 8 des Beispielteils beschrieben, sind dem Fachmann geläufig.
- 40 Zusätzliche Nukleinsäurefragmente, die biologisch aktive Abschnitte einer Desaturase kodieren, lassen sich durch Isolierung eines Teils einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11, Exprimieren des kodierten Abschnitt der Desaturase oder des Peptids (z.B. durch rekombinante Expression in vitro)
- 45 und Bestimmen der Aktivität des kodierten Teils der Desaturase oder des Peptids herstellen.

35

Die Erfindung umfasst zudem Nukleinsäuremoleküle, die sich von einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen (und Teilen davon) aufgrund des degenerierten genetischen Codes unterscheiden und somit die gleiche Desaturase

5 kodieren wie diejenige, die von den in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Nukleotidsequenzen kodiert wird. Bei einer anderen Ausführungsform hat ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die für ein Protein mit einer in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 gezeigten Aminosäuresequenz kodiert.

10 Bei einer weiteren Ausführungsform kodiert das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ein Vollängen-Desaturase-Protein, das zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 (die von einem in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten offenen Leseraster kodiert wird) im wesentlichen homolog ist und durch

15 gängige Methoden identifizierbar und isolierbar ist.

Zusätzlich zu den in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 gezeigten Desaturase-Nukleotidsequenzen erkennt der Fachmann, dass DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Änderungen in den Aminosäuresequenzen der Desaturasen führen, innerhalb einer Population

20 (z.B. der *Phaeodactylum tricornutum*-Population) existieren können. Diese genetischen Polymorphismen im Desaturase-Gen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund von natürlicher Variation existieren. Wie hier verwendet, bedeuten

25 die Begriffe "Gen" und "rekombinantes Gen" Nukleinsäuremoleküle mit einem offenen Leserahmen, der eine Desaturase, vorzugsweise eine *Phaeodactylum tricornutum* -Desaturase, kodiert. Diese natürlichen Varianten bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz des Desaturase-Gens. Sämtliche

30 und alle dieser Nukleotidvariationen und daraus resultierende Aminosäurepolymorphismen in der Desaturase, die das Ergebnis natürlicher Variation sind und die funktionelle Aktivität von Desaturasen nicht verändern, sollen im Umfang der Erfindung enthalten sein.

35

Nukleinsäuremoleküle, die den natürlichen Varianten entsprechen, und nicht-*Phaeodactylum tricornutum*-Homologen, -Derivate und -Analoge der *Phaeodactylum tricornutum*-cDNA können auf der Grundlage ihrer Homologie zu der hier offenbarten *Phaeodactylum*

40 *tricornutum*-Desaturase-Nukleinsäure unter Verwendung der *Phaeodactylum tricornutum*-cDNA oder eines Teils davon als Hybridisierungssonde gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter stringenten Hybridisierungsbedingungen isoliert werden. Bei einer anderen Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes isoliertes

45 Nukleinsäuremolekül mindestens 15 Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 umfasst.

36

Bei anderen Ausführungsformen ist die Nukleinsäure mindestens 25, 50, 100, 250 oder mehr Nukleotide lang. Der Begriff "hybridisiert unter stringenten Bedingungen", wie hier verwendet, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen Nukleotidsequenzen, die mindestens 60 % homolog zueinander sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, dass Sequenzen, die mindestens etwa 65 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 75 % oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Diese stringenten Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und lassen sich in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6., finden. Ein bevorzugtes, nicht einschränkendes Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungen in 6 x Natriumchlorid/Natriumcitrat (sodium chloride/sodium citrate = SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren Waschschritten in 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei 50 bis 65°C. Dem Fachmann ist bekannt, dass diese Hybridisierungsbedingungen sich je nach dem Typ der Nukleinsäure und, wenn beispielsweise organische Lösungsmittel vorliegen, hinsichtlich der Temperatur und der Konzentration des Puffers unterscheiden. Die Temperatur unterscheidet sich beispielsweise unter "Standard-Hybridisierungsbedingungen" je nach dem Typ der Nukleinsäure zwischen 42°C und 58°C in wässrigem Puffer mit einer Konzentration von 0,1 bis 5 x SSC (pH 7,2). Falls organisches Lösungsmittel im oben genannten Puffer vorliegt, zum Beispiel 50 % Formamid, ist die Temperatur unter Standardbedingungen etwa 42°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 20°C bis 45°C, vorzugsweise zwischen 30°C und 45°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:RNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise zwischen 45°C und 55°C. Die vorstehend genannten Hybridisierungstemperaturen sind beispielsweise für eine Nukleinsäure mit etwa 100 bp (= Basenpaare) Länge und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid bestimmt. Der Fachmann weiß, wie die erforderlichen Hybridisierungsbedingungen anhand von Lehrbüchern, wie dem vorstehend erwähnten oder aus den folgenden Lehrbüchern Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames und Higgins (Hrsgb.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Hrsgb.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford, bestimmt werden können.

Vorzugsweise entspricht ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül, das unter stringenten Bedingungen an eine Sequenz der SEQ ID NO:1, 3, 5 oder 11 hybridisiert, einem natürlich vor-

37

kommenden Nukleinsäuremolekül. Wie hier verwendet, betrifft ein "natürlich vorkommendes" Nukleinsäuremolekül ein RNA- oder DNA-Molekül mit einer Nukleotidsequenz, die in der Natur vorkommt (z.B. ein natürliches Protein kodiert). Bei einer Ausführungsform
5 kodiert die Nukleinsäure eine natürliche vorkommendes *Phaeodactylum tricornutum*-Desaturase.

Zusätzlich zu natürlich vorkommenden Varianten der Desaturase-sequenz, die in der Population existieren können, erkennt der
10 Fachmann ferner, dass auch Änderungen durch Mutation in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 eingebracht werden können, was zu Änderungen der Aminosäuresequenz der kodierten Desaturase führt, ohne dass die Funktionsfähigkeit des Desaturaseproteins beeinträchtigt wird. Beispielsweise
15 lassen sich Nukleotidsusbtitutionen, die an "nicht-essentiellen" Aminosäureresten zu Aminosäuresubstitutionen führen, in einer Sequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 herstellen. Ein "nicht-essentieller" Aminosäurerest ist ein Rest, der sich in einer Wildtyp-Desaturasequenz einer der Desaturasen (SEQ ID NO: 2, 4, 6
20 oder 12) verändern lässt, ohne dass die Aktivität der Desaturase verändert das heißt wesentlich reduziert wird, wohingegen ein "essentieller" Aminosäurerest für die Desaturaseaktivität erforderlich ist. Andere Aminosäurereste (z.B. diejenigen, die in der Domäne mit Desaturaseaktivität nicht konserviert oder
25 lediglich semikonserviert sind) können jedoch für die Aktivität nicht essentiell sein und lassen sich somit verändern, ohne dass die Desaturaseaktivität verändert wird.

Folglich betrifft ein weiterer Aspekt der Erfindung Nukleinsäuremoleküle, die Desaturasen kodieren, die veränderte Aminosäurereste enthalten, die für die Desaturaseaktivität nicht essentiell sind. Diese Desaturasen unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz von einer Sequenz in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 und behalten dennoch zumindest eine der hier beschriebenen
35 Desaturaseaktivitäten. Das isolierte Nukleinsäuremolekül umfasst bei einer Ausführungsform eine Nukleotidsequenz, die ein Protein kodiert, wobei das Protein eine Aminosäuresequenz mit mindestens etwa 50 % Homologie zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 umfasst und am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zell-
40 membranen in *Phaeodactylum tricornutum* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann. Das von dem Nukleinsäuremolekül kodierte Protein ist vorzugsweise mindestens etwa 50 bis 60 % homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 stärker bevorzugt mindestens etwa 60 bis 70 % homolog zu einer der Sequenzen in
45 SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 noch stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % homolog zu einer

der Sequenzen in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 % oder 99 % homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12.

- 5 Zur Bestimmung der prozentualen Homologie von zwei Aminosäuresequenzen (z.B. einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 und einer mutierten Form davon) oder von zwei Nukleinsäuren werden die Sequenzen zum Zweck des optimalen Vergleichs untereinander geschrieben (z.B. können Lücken in die Sequenz eines
- 10 Proteins oder einer Nukleinsäure eingefügt werden, um ein optimales Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nukleinsäure zu erzeugen). Die Aminosäurereste oder Nukleotide an den entsprechenden Aminosäurepositionen oder Nukleotidpositionen werden dann verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz (z.B.
- 15 einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12) durch den gleichen Aminosäurerest oder das gleiche Nukleotid wie die entsprechende Stelle in der anderen Sequenz (z.B. einer mutierten Form der aus SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ausgewählten Sequenz) belegt wird, dann sind die Moleküle an dieser Position homolog
- 20 (d.h. Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Homologie", wie hier verwendet, entspricht Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Identität"). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl an identischen Positionen, die den Sequenzen gemeinsam sind (d.h. % Homologie = Anzahl der
- 25 identischen Positionen/Gesamtanzahl der Positionen x 100). Die Begriffe Homologie und Identität sind damit als Synonym anzusehen.

- Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das eine Desaturase kodiert,
- 30 die zu einer Proteinsequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 homolog ist, kann durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 erzeugt werden, so dass eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -additionen
- 35 oder -deletionen in das kodierte Protein eingebracht werden. Mutationen können in eine der Sequenzen der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 durch Standardtechniken, wie stellenspezifische Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, eingebracht werden. Vorzugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an
- 40 einer oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäureresten hergestellt. Bei einer "konservativen Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest gegen einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten
- 45 definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen

39

- polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), unpolaren Seitenketten, (z.B. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten (z.B.
- 5 Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einer Desaturase wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest aus der gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. Alternativ können bei einer
- 10 anderen Ausführungsform die Mutationen zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der Desaturase-kodierenden Sequenz eingebracht werden, z.B. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können nach der hier beschriebenen Desaturase-Aktivität durchmustert werden, um Mutanten zu identifizieren,
- 15 die Desaturaseaktivität beibehalten. Nach der Mutagenese einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 kann das kodierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann z.B. unter Verwendung der hier beschriebenen Tests (siehe Beispielteil) bestimmt werden.
- 20
- Zusätzlich zu den Nukleinsäuremolekülen, welche die vorstehend beschriebenen Desaturasen kodieren, betrifft ein weiterer Aspekt der Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle, die "Antisense" zu den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen sind. Eine "Anti-
- 25 sense"-Nukleinsäure umfasst eine Nukleotidsequenz, die zu einer "Sense"-Nukleinsäure, welche ein Protein kodiert, komplementär ist, z.B. komplementär zum kodierenden Strang eines doppelsträngigen cDNA-Moleküls oder komplementär zu einer mRNA-Sequenz. Eine Antisense-Nukleinsäure kann folglich über Wasserstoff-
- 30 brückenbindungen an eine Sense-Nukleinsäure binden. Die Antisense-Nukleinsäure kann zu einem gesamten Desaturase-kodierenden Strang oder nur zu einem Teil davon komplementär sein. Bei einer Ausführungsform ist ein Antisense-Nukleinsäuremolekül "Antisense" zu einem "kodierenden Bereich" des kodierenden Strangs einer
- 35 Nukleotidsequenz, die eine Desaturase kodiert. Der Begriff "kodierender Bereich" betrifft den Bereich der Nukleotidsequenz, der Codons umfasst, die in Aminosäurereste translatiert werden (z.B. den gesamten kodierenden Bereich, der mit dem Stopcodon beginnt und endet, d.h. dem letzten Codon vor dem Stopcodon).
- 40 Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Antisense-Nukleinsäuremolekül "Antisense" zu einem "nicht-kodierenden Bereich" des kodierenden Strangs einer Nukleotidsequenz, die Desaturase kodiert. Der Begriff "nicht-kodierender Bereich" betrifft 5'- und 3'-Sequenzen, die den kodierenden Bereich flankieren und
- 45 nicht in Aminosäuren translatiert werden (d.h. die man auch als 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche bezeichnet).

40

Unter Voraussetzung der hier offenbarten Desaturase-kodierenden Sequenzen des kodierenden Stranges (z.B. die in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 dargestellten Sequenzen) können erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuren gemäß den Regeln der Watson-Crick-Basen-paarung gestaltet werden. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann komplementär zum gesamten kodierenden Bereich von Desaturase-mRNA sein, ist aber stärker bevorzugt ein Oligonukleotid, das nur zu einem Teil des kodierenden oder nicht-kodierenden Bereichs von Desaturase-mRNA "Antisense" ist. Das Antisense-Oligonukleotid kann z.B. zu dem Bereich, der die Translationsstartstelle von Desaturase-mRNA umgibt, komplementär sein. Ein Antisense-Oligonukleotid kann z.B. etwa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 und mehr Nukleotide lang sein. Eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure kann unter Verwendung chemischer Synthese und enzymatischer Ligationsreaktionen mittels im Fachgebiet bekannter Verfahren konstruiert werden. Eine Antisense-Nukleinsäure (z.B. ein Antisense-Oligonukleotid) kann z.B. chemisch synthetisiert werden, wobei natürlich vorkommende Nukleotide oder verschiedentlich modifizierte Nukleotide verwendet werden, die so gestaltet sind, dass sie die biologische Stabilität der Moleküle erhöhen oder die physikalische Stabilität des zwischen der Antisense- und der Sense-Nukleinsäure gebildeten Duplexes erhöhen, beispielsweise können Phosphorthioat-Derivate und acridinsubstituierte Nukleotide verwendet werden. Beispiele für modifizierte Nukleotide, die zur Erzeugung der Antisense-Nukleinsäure verwendet werden können, sind u.a. 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Chloruracil, 5-Ioduracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, Beta-D-Galactosylqueosin, Inosin, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, Beta-D-Mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure (v), Wybutoxosin, Desaturaseudouracil, Queosin, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure (v), 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil, (acp3)w und 2,6-Diaminopurin. Die Antisense-Nukleinsäure kann alternativ biologisch unter Verwendung eines Expressionsvektors hergestellt werden, in den eine Nukleinsäure in Antisense-Richtung subkloniert worden ist (d.h. RNA, die von der eingebrachten Nukleinsäure transkribiert wird, ist zu einer Zielnukleinsäure von Interesse in Antisense-Richtung orientiert, was im nachstehenden Unterabschnitt weiter beschrieben ist).

41

Die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuremoleküle werden üblicherweise an eine Zelle verabreicht oder in situ erzeugt, so dass sie mit der zellulären mRNA und/oder der genomischen DNA, die eine Desaturase kodiert, hybridisieren oder daran binden, 5 um dadurch die Expression des Proteins, z.B. durch Hemmung der Transkription und/oder Translation, zu hemmen. Die Hybridisierung kann durch herkömmliche Nukleotidkomplementarität unter Bildung eines stabilen Duplexes oder z.B. im Fall eines Antisense-Nukleinsäuremoleküls, das DNA-Duplexes bindet, durch spezifische 10 Wechselwirkungen in der großen Furche der Doppelhelix erfolgen. Das Antisense-Molekül kann so modifiziert sein, dass es spezifisch an einen Rezeptor oder an ein auf einer ausgewählten Zelloberfläche exprimiertes Antigen bindet, z.B. durch Binden des Antisense-Nukleinsäuremoleküls an ein Peptid oder einen Anti- 15 körper, das/der an einen Zelloberflächenrezeptor oder ein Antigen bindet. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann auch unter Verwendung der hier beschriebenen Vektoren den Zellen zugeführt werden. Zur Erzielung ausreichender intrazellulärer Konzentrationen der Antisense-Moleküle sind Vektorkonstrukte, in denen 20 sich das Antisense-Nukleinsäuremolekül unter der Kontrolle eines starken prokaryotischen, viralen oder eukaryotischen, einschließlich pflanzlichen, Promotors befindet, bevorzugt.

Bei einer weiteren Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuremolekül ein α -anomerer Nukleinsäuremolekül. Ein 25 α -anomerer Nukleinsäuremolekül bildet spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA, wobei die Stränge im Gegensatz zu gewöhnlichen β -Einheiten parallel zueinander verlaufen. (Gaultier et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:6625-6641). Das Antisense- 30 Nukleinsäuremolekül kann zudem ein 2'-O-Methylribonukleotid (Inoue et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) oder ein chimäres RNA-DNA-Analogon (Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 215:327-330) umfassen.

35 Bei einer weiteren Ausführungsform ist eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure ein Ribozym. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle mit Ribonukleaseaktivität, die eine einzelsträngige Nukleinsäure, wie eine mRNA, spalten können, zu der sie einen komplementären Bereich haben. Somit können Ribozyme (z.B. Hammer- 40 head-Ribozyme (beschrieben in Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591)) zur katalytischen Spaltung von Desaturase-mRNA-Transkripten verwendet werden, um dadurch die Translation von Desaturase-mRNA zu hemmen. Ein Ribozym mit Spezifität für eine Desaturase-kodierende Nukleinsäure kann auf der Basis der Nukleo- 45 tidsequenz einer der in SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 offenbarten Desaturase-cDNA (d.h. oder auf der Basis einer gemäß den in dieser Erfindung gelehrteten Verfahren zu isolierenden heterologen

42

Sequenz gestaltet werden. Beispielsweise kann ein Derivat einer Tetrahymena-L-19-IVS-RNA konstruiert werden, wobei die Nukleotidsequenz der aktiven Stelle komplementär zu der Nukleotidsequenz ist, die in einer Desaturase-kodierenden mRNA gespalten werden soll. Siehe z.B. Cech et al., US-Patent Nr. 4,987,071 und Cech et al., US-Patent Nr. 5,116,742. Alternativ kann Desaturase-mRNA zur Selektion einer katalytischen RNA mit einer spezifischen Ribonukleaseaktivität aus einem Pool von RNA-Molekülen verwendet werden. Siehe z.B. Bartel, D., und Szostak, J.W. (1993) Science 261:1411-1418.

Alternativ lässt sich die Desaturase-Gen-Expression hemmen, indem Nukleotidsequenzen, die komplementär zum regulatorischen Bereich einer Desaturase-Nukleotidsequenz (z.B. einem Desaturase-Promotor und/oder -Enhancer) sind, so dirigiert werden, dass Dreifachhelix-Strukturen gebildet werden, welche die Transkription eines Desaturase-Gens in Zielzellen hemmen. Siehe allgemein Helene, C. (1991) Anticancer Drug Res. 6(6) 569-84; Helene, C., et al. (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:27-36; und Maher, L.J. (1992) Bioassays 14(12):807-815.

B. Genkonstrukt (= Nukleinsäurekonstrukt, -fragment oder Expressionskassette)

Unter der erfindungsgemäßen Expressionskassette sind die in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 genannten Sequenzen, die sich als Ergebnis des genetischen Codes und/oder deren funktionellen oder nicht funktionellen Derivate zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden und welche vorteilhaft die Expression der codierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder

43

dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten

- 5 Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell
- 10 verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die Δ -5-Desaturase-/ Δ -6-Desaturase und/oder Δ -12-Desaturasegene
- 15 können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten

- 20 Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem bei-
- 25 spielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sind ein oder mehrere Genkonstrukte, die eine oder mehrere Sequenzen enthalten, die durch Seq ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 oder 11 definiert sind und gem.

- 30 SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 oder 12 Polypeptide kodieren. Dabei stammen SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 und 11 von Desaturasen während SEQ ID NO: 9 für eine Elongase codiert. Desaturasen codierende Enzyme, die eine Doppelbindung in Δ -5-, Δ -6- oder Δ -12-Position einführen, wobei das Substrat ein, zwei, drei oder vier Doppel-
- 35 bindungen aufweisen. Die in SEQ ID NO: 9 dargestellte Sequenz codiert für eine Enzymaktivität, die eine Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert sowie ihre Homologen, Derivate oder Analoga, die funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen, vorteilhafterweise zur Steigerung
- 40 der Genexpression, verbunden sind. Beispiele für diese Regulationssequenzen sind Sequenzen, an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen
- 45 noch vorhanden sein und, wenn geeignet, genetisch modifiziert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet worden ist und die Expression der Gene gesteigert worden ist.

44

Das Genkonstrukt kann jedoch auch eine einfachere Struktur haben, d.h. dass keine zusätzlichen Regulationssignale vor der Sequenz SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 oder ihren Homologen inseriert worden sind und der natürliche Promotor mit seiner Regulation nicht
5 deletiert worden ist. Statt dessen ist die natürliche Regulationssequenz so mutiert worden, dass keine Regulation mehr stattfindet und die Genexpression verstärkt ist. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte Enhancer-Sequenzen, die funktionsfähig mit dem Promotor verbunden
10 sind und die gesteigerte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen, umfassen. Es ist auch möglich, am 3'-Ende der DNA-Sequenzen zusätzlich vorteilhafte Sequenzen zu inserieren, beispielsweise weitere Regulationselemente oder Terminatoren. Die Desaturasegene und das Elongasegen können im Genkonstrukt in
15 einer oder mehreren Kopien vorliegen. Sie können in einem Genkonstrukt oder mehreren Genkonstrukten vorliegen. Dieses Genkonstrukt oder die Genkonstrukte können zusammen im Wirtorganismus exprimiert werden. Dabei kann das Genkonstrukt oder die Genkonstrukte in einem oder mehreren Vektoren inseriert sein
20 und frei in der Zelle vorliegen oder aber im Genom inseriert sein. Es ist vorteilhaft für die Insertion weiterer Gene in Organismen, wenn weitere Gene im Genkonstrukt vorliegen.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das neue Verfahren liegen
25 beispielsweise in Promotoren vor, wie dem *cos*-, *tac*-, *trp*-, *tet*-, *trp-tet*-, *lpp*-, *lac*-, *lpp-lac*-, *lacI^q*-, *T7*-, *T5*-, *T3*-, *gal*-, *trc*-, *ara*-, *SP6*-, λ -*P_R*- oder λ -*P_L*-Promotor und werden vorteilhafterweise in Gram-negativen Bakterien angewendet. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen liegen beispielsweise in den Gram-positiven
30 Promotoren *amy* und *SPO2*, in den Hefe- oder Pilzpromotoren *ADC1*, *MF α* , *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* oder in den Pflanzenpromotoren *CaMV/35S* [Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294], *PRP1* [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], *SSU*, *OCS*, *lib4*, *usp*, *STLS1*, *B33*, *nos* oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor
35 vor. In diesem Zusammenhang vorteilhaft sind ebenfalls induzierbare Promotoren, wie die in EP-A-0 388 186 (Benzylsulfonamid-induzierbar), Plant J. 2, 1992:397-404 (Gatz et al., Tetra-cyclin-induzierbar), EP-A-0 335 528 (Abzisinäure-induzierbar) oder WO 93/21334 (Ethanol- oder Cyclohexenol-induzierbar) be-
40 schriebenen Promotoren. Weitere geeignete Pflanzenpromotoren sind der Promotor von cytosolischer FBPase oder der ST-LSI-Promotor der Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445), der Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase-Promotor aus *Glycine max* (Genbank-Zugangsnr. U87999) oder der in EP-A-0 249 676
45 beschriebene nodienspezifische Promotor. Besonders vorteilhafte Promotoren sind Promotoren, welche die Expression in Geweben ermöglichen, die an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind. Ganz

45

besonders vorteilhaft sind samenspezifische Promotoren, wie der ausführungsgemäße USP Promotor aber auch andere Promotoren wie der LeB4- (Baeumlein et al., Plant J., 1992, 2 (2) (2):233-239), DC3 (Thomas, Plant Cell 1996, 263:359-368), Phaseolin- oder

5 Napin-Promotor. Weitere besonders vorteilhafte Promotoren sind samenspezifische Promotoren, die für monokotyle oder dikotyle Pflanzen verwendet werden können und in US 5,608,152 (Napin-Promotor aus Raps), WO 98/45461 (Oleosin-Promotor aus Arobidopsis), US 5,504,200 (Phaseolin-Promotor aus Phaseolus

10 vulgaris), WO 91/13980 (Bce4-Promotor aus Brassica), von Baeumlein et al., Plant J., 1992, 2 (2):233-239 (LeB4-Promotor aus einer Leguminose) beschrieben sind, wobei sich diese Promotoren für Dikotyledonen eignen. Die folgenden Promotoren eignen sich beispielsweise für Monokotyledonen lpt-2-

15 oder lpt-1-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230), Hordein-Promotor aus Gerste und andere, in WO 99/16890 beschriebene geeignete Promotoren.

Es ist im Prinzip möglich, alle natürlichen Promotoren mit ihren

20 Regulationssequenzen, wie die oben genannten, für das neue Verfahren zu verwenden. Es ist ebenfalls möglich und vorteilhaft, zusätzlich synthetische Promotoren zu verwenden.

Das Genkonstrukt kann, wie oben beschrieben, auch weitere Gene

25 umfassen, die in die Organismen eingebracht werden sollen. Es ist möglich und vorteilhaft, in die Wirtsorganismen Regulationsgene, wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, welche durch ihre Enzymaktivität in die Regulation eines oder mehrerer Gene eines Biosynthesewegs eingreifen, einzubringen und darin zu

30 exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen Ursprungs sein. Weiterhin können vorteilhaft im Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthalten sein oder aber diese Gene können auf einem weiteren oder mehreren weiteren Nukleinsäure-

35 konstrukten liegen. Vorteilhaft werden als Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ein Gen ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n),

40 Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym, A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) oder deren Kombinationen verwendet.

46

Genkonstrukte umfassen vorteilhafterweise zur Expression der anderen vorliegenden Gene weitere 3'- und/oder 5'-terminale Regulationssequenzen zur Steigerung der Expression, die in Abhängigkeit vom gewählten Wirtsorganismus und dem Gen oder 5 den Genen für die optimale Expression ausgewählt werden. Diese Regulationssequenzen sollen, wie oben erwähnt, die spezifische Expression der Gene und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann je nach dem Wirtsorganismus beispielsweise bedeuten, dass das Gen nur nach Induktion exprimiert oder 10 überexprimiert wird oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die Regulationssequenzen oder -faktoren können außerdem vorzugsweise eine vorteilhafte Wirkung auf die Expression der ein- 15 gebrachten Gene haben und diese somit steigern. Auf diese Weise ist es möglich, dass die Regulationselemente unter Verwendung starker Transkriptionssignale, wie Promotoren und/oder Enhancer, vorteilhafterweise auf Transkriptionsebene verstärkt werden. Es ist jedoch weiterhin auch möglich, die Translation zum Beispiel 20 durch Verbesserung der mRNA-Stabilität zu verstärken.

C. Rekombinante Expressionsvektoren und Wirtszellen

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, die eine Nukleinsäure enthalten, 25 die eine Desaturase allein (oder einen Teil davon) oder ein unter Punkt b beschriebenes Nukleinsäurekonstrukt in dem die erfindungsgemäße Nukleinsäure allein oder in Kombination mit weiteren Biosynthesegenen des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels 30 wie Desaturasen oder Elongasen enthalten ist. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere Nukleinsäure transportieren kann, an welche es gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein "Plasmid", was für eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife steht, in die zusätzlichen DNA- 35 Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp ist ein viraler Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren können in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind, autonom replizieren (z.B. Bakterienvektoren mit bakteriellem 40 Replikationsursprung und episomale Säugervektoren). Andere Vektoren (z.B. nicht-episomale Säugervektoren) werden beim Einbringen in die Wirtszelle in das Genom einer Wirtszelle integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Zudem können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, mit 45 denen sie funktionsfähig verbunden sind, steuern. Diese Vektoren werden hier als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Gewöhnlich haben Expressionsvektoren, die für DNA-Rekombinationstechniken

geeignet sind, die Form von Plasmiden. In der vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll jedoch diese anderen

- 5 Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren (z.B. replikationsdefiziente Retroviren, Adenoviren und adenoverwandte Viren), die ähnliche Funktionen ausüben, umfassen. Ferner soll der Begriff Vektor auch andere Vektoren, die dem Fachmann bekannt sind, wie Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, 10 Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA, umfassen.

Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren umfassen eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes

- 15 Genkonstrukt in einer Form, die sich zur Expression der Nukleinsäure in einer Wirtszelle eignet, was bedeutet, dass die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere Regulationssequenzen, ausgewählt auf der Basis der zur Expression zu verwendenden Wirtszellen, die mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden ist, umfasst. In einem 20 rekombinanten Expressionsvektor bedeutet "funktionsfähig verbunden", dass die Nukleotidsequenz von Interesse derart an die Regulationssequenz(en) gebunden ist, dass die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist und sie aneinander gebunden 25 sind, so dass beide Sequenzen die vorhergesagte, der Sequenz zugeschriebene Funktion erfüllen (z.B. in einem In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die Wirtszelle eingebracht wird). Der Begriff "Regulationssequenz" soll Promotoren, Enhancer und 30 andere Expressionskontrollelemente (z.B. Polyadenylierungssignale) umfassen. Diese Regulationssequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), oder siehe: Gruber und Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology 35 and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, Hrsgb.: Glick und Thompson, Kapitel 7, 89-108, einschließlich der Literaturstellen darin. Regulationssequenzen umfassen solche, welche die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, welche die direkte Expression der 40 Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen unter bestimmten Bedingungen steuern. Der Fachmann weiß, dass die Gestaltung des Expressionsvektors von Faktoren, wie der Auswahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem Ausmaß der Expression des gewünschten Proteins usw., abhängen kann. Die erfindungsgemäßen 45 Expressionsvektoren können in Wirtszellen eingebracht werden, um dadurch Proteine oder Peptide, einschließlich Fusionsproteinen oder -peptiden, herzustellen, die von den Nukleinsäuren, wie hier

beschrieben, kodiert werden (z.B. Desaturasen, mutante Formen von Desaturasen, Fusionsproteine usw.).

- Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren können
- 5 zur Expression von Desaturasen und Elongasen in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen gestaltet sein. Beispielsweise können Desaturasegene in bakteriellen Zellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen (unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen (siehe Romanos, M.A.,
- 10 et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8:423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", in: More Gene Manipulations in Fungi, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428: Academic Press: San Diego; und van den Hondel,
- 15 C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F., et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), Algen (Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology.1, 3:239-251), Ciliaten der Typen: Holo-
- 20 trichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctorina, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucoma, Platyophrya, Potomacus, Desaturase-udocohnilembus, Euplotes, Engelmaniella und Stylonychia, insbesondere der Gattung Stylonychia lemnae, mit Vektoren nach einem Transformationsverfahren, wie beschrieben in WO 98/01572, sowie
- 25 Zellen vielzelliger Pflanzen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants" Plant Cell Rep.:583-586; Plant Molecular Biology and Biotechnology, C Press, Boca Raton, Florida, Kapitel 6/7,
- 30 S.71-119 (1993); F.F. White, B. Jeness et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 (und darin zitierte Literaturstellen)) oder
- 35 Säugerzellen exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden ferner erörtert in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der rekombinante Expressionsvektor kann alternativ, zum Beispiel unter Verwendung von T7-Promotor-Regulationssequenzen und
- 40 T7-Polymerase, in vitro transkribiert und translatiert werden.

- Die Expression von Proteinen in Prokaryoten erfolgt meist mit Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten, welche die Expression von Fusions- oder nicht-Fusions-
- 45 proteinen steuern. Fusionsvektoren fügen eine Reihe von Aminosäuren an ein darin kodiertes Protein an, gewöhnlich am Amino-terminus des rekombinanten Proteins, aber auch am C-Terminus

49

- oder fusioniert innerhalb geeigneter Bereiche in den Proteinen. Diese Fusionsvektoren haben gewöhnlich drei Aufgaben: 1) die Verstärkung der Expression von rekombinantem Protein; 2) die Erhöhung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins und 3) die
- 5 Unterstützung der Reinigung des rekombinanten Proteins durch Wirkung als Ligand bei der Affinitätsreinigung. Bei Fusions-Expressionsvektoren wird oft eine proteolytische Spaltstelle an der Verbindungsstelle der Fusionseinheit und des rekombinanten Proteins eingebracht, so dass die Abtrennung des rekombinanten
- 10 Proteins von der Fusionseinheit nach der Reinigung des Fusionsproteins möglich ist. Diese Enzyme und ihre entsprechenden Erkennungssequenzen umfassen Faktor Xa, Thrombin und Entero-kinase.
- 15 Typische Fusions-Expressionsvektoren sind u.a. pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B., und Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das
- 20 rekombinante Zielprotein fusioniert wird. Bei einer Ausführungsform ist die Desaturase-kodierende Sequenz in einen pGEX-Expressionsvektor kloniert, so dass ein Vektor erzeugt wird, der ein Fusionsprotein kodiert, das vom N-Terminus zum C-Terminus GST-Thrombin-Spaltstelle-X-Protein umfasst. Das Fusionsprotein
- 25 kann durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Glutathion-Agarose-Harz gereinigt werden. Rekombinante Desaturase, die nicht an GST fusioniert ist, kann durch Spaltung des Fusionsproteins mit Thrombin gewonnen werden.
- 30 Beispiele für geeignete induzierbare nicht-Fusions-E. coli-Expressionsvektoren sind u.a. pTrc (Amann et al. (1988) *Gene* 69:301-315) und pET 11d (Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89). Die Zielgenexpression vom pTrc-Vektor
- 35 beruht auf der Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor. Die Zielgenexpression aus dem pET 11d-Vektor beruht auf der Transkription von einem T7-gn10-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird
- 40 von den Wirtsstämmen BL21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem residenten λ -Prophagen bereitgestellt, der ein T7 gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.

Andere in prokaryotischen Organismen geeignete Vektoren sind dem

45 Fachmann bekannt, diese Vektoren sind beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, die pBR-Reihe, wie pBR322, die pUC-Reihe, wie pUC18 oder pUC19, die M13mp-Reihe, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2,

- pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, λ gt11 or pBdCI, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667. Eine Strategie zur Maximierung der Expression von rekombinantem
- 5 Protein ist die Expression des Proteins in einem Wirtsbakterium, dessen Fähigkeit zur proteolytischen Spaltung des rekombinanten Proteins gestört ist (Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 119-128). Eine weitere Strategie ist die Veränderung der
- 10 Nukleinsäuresequenz der in einen Expressionsvektor zu inserieren- den Nukleinsäure, so dass die einzelnen Codons für jede Amino- säure diejenigen sind, die vorzugsweise in einem zur Expression ausgewählten Bakterium, wie *C. glutamicum*, verwendet werden (Wada et al. (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118). Diese
- 15 Veränderung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen erfolgt durch Standard-DNA-Synthesetechniken.

- Bei einer weiteren Ausführungsform ist der Desaturase- Expressionsvektor ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für
- 20 Vektoren zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen pYeDesaturasec1 (Baldari et al. (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Kon-
- 25 struktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie den filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of fungi,
- 30 J.F. Peberdy et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, oder in: More Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428: Academic Press: San Diego]. Weitere geeignete Hefevektoren sind beispielsweise pAG-1, YEpl6, YEpl3 oder pEMBLYe23.

35

- Alternativ können die erfindungsgemäßen Desaturasen in Insekten- zellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (z.B. Sf9-Zellen) ver-
- 40 fügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170:31-39).

- Die oben genannten Vektoren bieten nur einen kleinen Überblick
- 45 über mögliche geeignete Vektoren. Weitere Plasmide sind dem Fachmann bekannt und sind zum Beispiel beschrieben in: Cloning

51

Vectors (Hrsgb. Pouwels, P.H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018).

- Bei noch einer weiteren Ausführungsform wird eine erfindungs-
5 gemäßige Nukleinsäure in Säugerzellen unter Verwendung eines
Säuger-Expressionsvektors exprimiert. Unter Säugern werden
im Sinne der Erfindung alle nicht-humanen Säuger verstanden.
Beispiele für Säuger-Expressionsvektoren umfassen pCDM8 (Seed,
B. (1987) Nature 329:840) und pMT2PC (Kaufman et al. (1987)
10 EMBO J. 6:187-195). Bei der Verwendung in Säugerzellen werden
die Kontrollfunktionen des Expressionsvektors oft von viralen
Regulationselementen bereitgestellt. Üblicherweise verwendete
Promotoren stammen z.B. aus Polyoma, Adenovirus2, Cytomegalie-
virus und Simian Virus 40. Weitere geeignete Expressionssysteme
15 für prokaryotische und eukaryotische Zellen siehe in den Kapiteln
16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T.,
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring
Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold
Spring Harbor, NY, 1989.
- 20 Bei einer anderen Ausführungsform kann der rekombinante Säuger-
Expressionsvektor die Expression der Nukleinsäure vorzugsweise in
einem bestimmten Zelltyp steuern (z.B. werden gewebespezifische
Regulationselemente zur Expression der Nukleinsäure verwendet).
- 25 Gewebespezifische Regulationselemente sind im Fachgebiet bekannt.
Nicht beschränkende Beispiele für geeignete gewebespezifische
Promotoren sind u.a. der Albuminpromotor (leberspezifisch;
Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1:268-277), lymphoidspezifische
Promotoren (Calame und Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275),
30 insbesondere Promotoren von T-Zellrezeptoren (Winoto und
Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733) und Immunglobulinen (Banerji
et al. (1983) Cell 33:729-740; Queen und Baltimore (1983) Cell
33:741-748), neuronspezifische Promotoren (z.B. Neurofilament-
Promotor; Byrne und Ruddle (1989) PNAS 86:5473-5477), pankreas-
35 spezifische Promotoren (Edlund et al., (1985) Science
230:912-916) und milchdrüsenspezifische Promotoren (z.B. Milch-
serum-Promotor; US-Patent Nr. 4,873,316 und Europäische Patent-
anmeldung-Veröffentlichung Nr. 264,166). Auch entwicklungs-
regulierte Promotoren sind umfasst, z.B. die hox-Promotoren
40 der Maus (Kessel und Gruss (1990) Science 249:374-379) und
der Fetoprotein-Promotor (Campes und Tilghman (1989) Genes Dev.
3:537-546).

- Bei einer weiteren Ausführungsform können die erfindungsgemäßen
45 Desaturasen in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen), siehe
Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1 (3):239-251
und darin zitierte Literaturangaben, und Pflanzenzellen aus

- höheren Pflanzen (z.B. Spermatophyten, wie Feldfrüchten) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., und Masterson, R. (1992) "New plant
5 binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12:8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and
10 Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

- Eine Pflanzen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Regulationssequenzen, welche die Genexpression in Pflanzen-
15 zellen steuern können und funktionsfähig verbunden sind, so dass jede Sequenz ihre Funktion, wie Termination der Transkription, erfüllen kann, beispielsweise Polyadenylierungssignale. Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind diejenigen, die aus Agrobacterium tumefaciens-t-DNA stammen, wie das als Octopinsynthase
20 bekannte Gen 3 des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835ff.) oder funktionelle Äquivalente davon, aber auch alle anderen in Pflanzen funktionell aktiven Terminatoren sind geeignet.
- 25 Da die Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf Transkriptionsebenen beschränkt ist, enthält eine Pflanzen-Expressionskassette vorzugsweise andere funktionsfähig verbunden Sequenzen, wie Translationsenhancer, beispielsweise die Overdrive-Sequenz, welche die 5'-untranslatierte Leader-Sequenz aus Tabakmosaik-
30 virus, die das Protein/RNA-Verhältnis erhöht, enthält (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15:8693-8711).

- Die Pflanzengenexpression muss funktionsfähig mit einem geeigneten Promotor verbunden sein, der die Genexpression auf
35 rechtzeitige, zell- oder gewebespezifische Weise durchführt. Bevorzugt sind Promotoren, welche die konstitutive Expression herbeiführen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195-2202), wie diejenigen, die von Pflanzenviren stammen, wie 35S CAMV (Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294), 19S CaMV (siehe auch US 5352605
40 und WO 84/02913) oder Pflanzenpromotoren, wie der in US 4,962,028 beschriebene der kleinen Untereinheit der Rubisco.

- Andere bevorzugte Sequenzen für die Verwendung zur funktionsfähigen Verbindung in Pflanzengenexpressions-Kassetten sind
45 Targeting-Sequenzen, die zur Steuerung des Genproduktes in sein entsprechendes Zellkompartiment notwendig sind (siehe eine Übersicht in Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423

und darin zitierte Literaturstellen), beispielsweise in die Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden, wie Amyloplasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den extrazellulären Raum, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Ölkörper, 5 Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen.

Die Pflanzengenexpression lässt sich auch über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108).

- 10 Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein 15 Ethanol-induzierbarer Promotor.

Auch Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stressbedingungen reagieren, sind geeignete Promotoren, beispielsweise der pathogeninduzierte PRP1-Gen-Promotor (Ward et al., Plant.

- 20 Mol. Biol. 22 (1993) 361-366), der hitzeinduzierbare hsp80-Promotor aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare Alpha-amylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder der durch Wunden induzierbare pinII-Promotor (EP-A-0 375 091).

- 25 Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die Genexpression in Geweben und Organen herbeiführen, in denen die Lipid- und Ölbiosynthese stattfindet, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos. Geeignete Promotoren sind der Napingen-Promotor aus Raps

- 30 (US 5,608,152), der USP-Promotor aus Vicia faba (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459-67), der Oleosin-Promotor aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris (US 5,504,200), der Bce4-Promotor aus Brassica (WO 91/13980) oder der Legumin-B4-Promotor (LeB4; 35 Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):233-9) sowie Promotoren, welche die samenspezifische Expression in Monokotyledonen-Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. herbeiführen. Geeignete beachtenswerte Promotoren sind der lpt2- oder lpt1-Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230)

- 40 oder die in WO 99/16890 beschriebenen (Promotoren aus dem Gersten-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem Reis-Prolamin-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen).

Insbesondere kann die multiparallele Expression von erfindungsgemäßen Desaturasen allein oder in Kombination mit anderen desaturasen oder Elongasen gewünscht sein. Die Einführung solcher Expressionskassetten kann über eine simultane Transformation
5 mehrerer einzelner Expressionskonstrukte erfolgen oder durch Kombination mehrerer Expressionskassetten auf einem Konstrukt. Auch können mehrere Vektoren mit jeweils mehreren Exopressionskassetten transformiert und auf die Wirtszelle übertragen werden.

10

Ebenfalls besonders geeignet sind Promotoren, welche die plastidenspezifische Expression herbeiführen, da Plastiden das Kompartiment sind, in dem die Vorläufer sowie einige Endprodukte der Lipidbiosynthese synthetisiert werden. Geeignete
15 Promotoren, wie der virale RNA-Polymerase-Promotor, sind beschrieben in WO 95/16783 und WO 97/06250, und der clpP-Promotor aus Arabidopsis, beschrieben in WO 99/46394.

Die Erfindung stellt zudem einen rekombinanten Expressions-
20 vektor bereit, umfassend ein erfindungsgemäßes DNA Molekül, das in Antisense-Richtung in den Expressionsvektor kloniert ist. d.h. das DNA-Molekül ist derart mit einer regulatorischen Sequenz funktionsfähig verbunden, dass die Expression (durch Transkription des DNA-Moleküls) eines RNA-Moleküls, das zur
25 Desaturase-mRNA "Antisense" ist, ermöglicht wird. Es können Regulationssequenzen ausgewählt werden, die funktionsfähig mit einer in Antisense-Richtung klonierten Nukleinsäure verbunden sind und die kontinuierliche Expression des Antisense-RNA-Moleküls in einer Vielzahl von Zelltypen steuern, zum Beispiel können
30 virale Promotoren und/oder Enhancer oder Regulationssequenzen ausgewählt werden, welche die konstitutive, gewebespezifische oder zelltypspezifische Expression von Antisense-RNA steuern. Der Antisense-Expressionsvektor kann in Form eines rekombinanten Plasmids, Phagemids oder attenuierten Virus vorliegen, in dem
35 Antisense-Nukleinsäuren unter der Kontrolle eines hochwirksamen regulatorischen Bereichs produziert werden, dessen Aktivität durch den Zelltyp bestimmt werden kann, in den der Vektor eingebracht worden ist. Eine Erläuterung der Regulation der Genexpression mittels Antisense-Genen siehe in Weintraub, H.,
40 et al., Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Bd. 1(1) 1986.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Wirtszellen, in die ein erfindungsgemäßer rekombinanter Expressionsvektor eingebracht
45 worden ist. Die Begriffe "Wirtszelle" und "rekombinante Wirtszelle" werden hier untereinander austauschbar verwendet. Selbstverständlich betreffen diese Begriffe nicht nur die bestimmte

Zielzelle, sondern auch die Nachkommen oder potentiellen Nachkommen dieser Zelle. Da in aufeinanderfolgenden Generationen aufgrund von Mutation oder Umwelteinflüssen bestimmte Modifikationen auftreten können, sind diese Nachkommen nicht unbedingt mit der

5 Parentalzelle identisch, sind jedoch immer noch vom Umfang des Begriffs, wie hier verwendet, umfasst.

Unter Rekombinant oder Transgen beispielsweise rekombinanten Expressionsvektor oder rekombinanten Wirt oder Wirtszellen im

10 Sinne der Erfindung ist zu verstehen, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und/oder deren natürliche Regulationssequenzen an 5' und 3'-Position der Nukleinsäuren nicht in ihrer natürlichen Umgebung sind, das heißt entweder wurde die Lage der Sequenzen im

15 Herkunftstorganismus verändert oder in diesem wurden die Nukleinsäuresequenzen und/oder die Regulationssequenzen mutiert oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen wurden in einen anderen Organismus als den Herkunftstorganismus verbracht oder deren Regulationssequenzen. Auch Kombinationen dieser Veränderungen sind möglich. Unter natürlicher Umgebung ist die Lage einer

20 Nukleinsäuresequenz in einem Organismus zu verstehen, wie er in der Natur vorkommt.

Eine Wirtszelle kann eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle sein. Zum Beispiel kann eine Desaturase in Bakterienzellen,

25 wie *C. glutamicum*, Insektenzellen, Pilzzellen oder Säugerzellen (wie Chinesischer Hamster-Ovarzellen (CHO) oder COS-Zellen), Algen, Ciliaten, Pflanzenzellen, Pilzen oder anderen Mikroorganismen, wie *C. glutamicum*, exprimiert werden. Andere geeignete Wirtszellen sind dem Fachmann geläufig.

30 Vektor-DNA lässt sich in prokaryotische oder eukaryotische Zellen über herkömmliche Transformations- oder Transfektionstechniken einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", Konjugation und Transduktion, wie hier verwendet, sollen eine

35 Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren zum Einbringen fremder Nukleinsäure (z.B. DNA) in eine Wirtszelle, einschließlich Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Coprecipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Lipofektion, natürliche Kompetenz, chemisch vermittelter Transfer, Elektro-

40 poration oder Teilchenbeschuss, umfassen. Geeignete Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Wirtszellen, einschließlich Pflanzenzellen, lassen sich finden in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

45 Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Labor-Handbüchern, wie Methods in Molecular Biology, 1995, Bd. 44, Agrobacterium

protocols, Hrsgb: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

Über die stabile Transfektion von Säugerzellen ist bekannt,
5 dass je nach verwendetem Expressionsvektor und verwendeter Transfektionstechnik nur ein kleiner Teil der Zellen die fremde DNA in ihr Genom integriert. Zur Identifikation und Selektion dieser Integranten wird gewöhnlich ein Gen, das einen selektierbaren Marker (z.B. Resistenz gegen Antibiotika) kodiert, zusammen
10 mit dem Gen von Interesse in die Wirtszellen eingebracht. Bevorzugte selektierbare Marker umfassen solche, welche Resistenz gegen Medikamente, wie G418, Hygromycin und Methotrexat, verleihen, oder in Pflanzen solche, welche Resistenz gegen ein Herbizid, wie Glyphosphat oder Glufosinat, verleihen. Weitere geeignete Marker sind beispielsweise Marker, welche Gene kodieren,
15 die an Biosynthesewegen von zum Beispiel Zuckern oder Aminosäuren beteiligt sind, wie β -Galactosidase, ura3 oder ilv2. Marker, welche Gene, wie Luziferase, gfp oder andere Fluoreszenzgene kodieren, sind ebenfalls geeignet. Diese Marker lassen sich in
20 Mutanten verwenden, in denen diese Gene nicht funktionell sind, da sie beispielsweise mittels herkömmlicher Verfahren deletiert worden sind. Ferner können Marker, welche eine Nukleinsäure kodieren, die einen selektierbaren Marker kodiert, in eine Wirtszelle auf dem gleichen Vektor eingebracht werden, wie derjenige,
25 der eine Desaturase kodiert, oder können auf einem gesonderten Vektor eingebracht werden. Zellen, die mit der eingebrachten Nukleinsäure stabil transfiziert worden sind, können zum Beispiel durch Medikamentenselektion identifiziert werden (z.B. überleben Zellen, die den selektierbaren Marker integriert haben, wohin-
30 gegen die anderen Zellen absterben).

Zur Erzeugung eines homolog rekombinierten Mikroorganismus wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines Desaturasegens enthält, in den eine Deletion, Addition oder
35 Substitution eingebracht worden ist, um dadurch das Desaturasegen zu verändern, z.B. funktionell zu disrumpieren. Dieses Desaturasegen ist vorzugsweise ein Phaeodactylum tricornutum Desaturasegen, es kann jedoch ein Homologon oder Analogon aus anderen Organismen, sogar aus einer Säuger-, Pilz- oder Insektenquelle
40 verwendet werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist der Vektor so gestaltet, dass das endogene Desaturasegen bei homologer Rekombination funktionell disrumptiert wird (d.h. nicht länger ein funktionelles Protein kodiert, auch als Knock-out-Vektor bezeichnet). Alternativ kann der Vektor so gestaltet
45 sein, dass das endogene Desaturasegen bei homologer Rekombination mutiert oder anderweitig verändert wird, aber immer noch ein funktionelles Protein kodiert (z.B. kann der stromaufwärts

gelegene regulatorische Bereich so verändert sein, dass dadurch die Expression der endogenen Desaturase verändert wird). Zur Erzeugung einer Punktmutation über homologe Rekombination können auch als Chimeraplasty bekannte DNA-RNA-Hybride verwendet werden, die aus Cole-Strauss et al., 1999, Nucleic Acids Research 27(5):1323-1330 und Kmiec, Gene therapy, 1999, American Scientist, 87(3):240-247 bekannt sind.

Im Vektor für die homologe Rekombination ist der veränderte Abschnitt des Desaturasegens an seinem 5'- und 3'-Ende von zusätzlicher Nukleinsäure des Desaturasegens flankiert, so dass homologe Rekombination zwischen dem exogenen Desaturasegen, das auf dem Vektor vorliegt, und einem endogenen Desaturasegen in einem Mikroorganismus oder einer Pflanze möglich ist. Die zusätzliche flankierende Desaturase-Nukleinsäure ist für eine erfolgreiche homologe Rekombination mit dem endogenen Gen hinreichend lang. Gewöhnlich sind im Vektor mehrere hundert Basenpaare bis zu Kilobasen flankierende DNA (sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende) enthalten (eine Beschreibung von Vektoren zur homologen Rekombination siehe z.B. in Thomas, K.R., und Capecchi, M.R. (1987) Cell 51:503 oder der Rekombination in Physcomitrella patens auf cDNA-Basis in Strepp et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (8):4368-4373). Der Vektor wird in einen Mikroorganismus oder eine Pflanzenzelle (z.B. mittels Polyethylenglycol-vermittelter DNA) eingebracht, und Zellen, in denen das eingebrachte Desaturasegen mit dem endogenen Desaturasegen homolog rekombiniert ist, werden unter Verwendung im Fachgebiet bekannter Techniken selektiert.

Bei einer anderen Ausführungsform können rekombinante Organismen, wie Mikroorganismen, hergestellt werden, die ausgewählte Systeme enthalten, welche eine regulierte Expression des eingebrachten Gens ermöglichen. Der Einschluß eines Desaturasegens in einen Vektor, wobei es unter die Kontrolle des lac-Operons gebracht wird, ermöglicht z.B. die Expression des Desaturasegens nur in Gegenwart von IPTG. Diese Regulationssysteme sind im Fachgebiet bekannt.

Eine erfindungsgemäße Wirtszelle, wie eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle, in Kultur oder auf einem Feld wachsend, kann zur Produktion (d.h. Expression) einer Desaturase verwendet werden. In Pflanzen kann zusätzlich ein alternatives Verfahren durch direkten Transfer von DNA in sich entwickelnde Blüten über Elektroporation oder Gentransfer mittels Agrobacterium angewendet werden. Die Erfindung stellt folglich ferner Verfahren zur Produktion von Desaturasen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Wirtszellen bereit. Bei einer Ausführungsform umfasst das

Verfahren die Anzucht der erfindungsgemäßen Wirtszelle (in die ein rekombinanter Expressionsvektor, der eine Desaturase kodiert, eingebracht worden ist, oder in deren Genom ein Gen eingebracht worden ist, das eine Wildtyp- oder veränderte Desaturase kodiert) in einem geeigneten Medium, bis die Desaturase produziert worden ist. Das Verfahren umfasst bei einer weiteren Ausführungsform das Isolieren der Desaturasen aus dem Medium oder der Wirtszelle.

Wirtszellen, die im Prinzip zum Aufnehmen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, des erfindungsgemäßen Genproduktes oder des erfindungsgemäßen Vektors geeignet sind, sind alle prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Die vorteilhafterweise verwendeten Wirtsorganismen sind Organismen, wie Bakterien, Pilze, Hefen, Tier- oder Pflanzenzellen. Weitere vorteilhafte Organismen sind Tiere oder vorzugsweise Pflanzen oder Teile davon. Pilze, Hefen oder Pflanzen werden vorzugsweise verwendet, besonders bevorzugt Pilze oder Pflanzen, ganz besonders bevorzugt Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Raps, Nachtkerze, Canola, Erdnuss, Lein, Soja, Safflor, Sonnenblume, Borretsch, oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölplume, Kokosnuß) sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Soja, Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Nachtkerze, Sonnenblume, Safflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuß).

30 D. Isolierte Desaturase

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft isolierte Desaturasen und biologisch aktive Teile davon. Ein "isoliertes" oder "gereinigtes" Protein oder ein biologisch aktiver Teil davon ist im wesentlichen frei von zellulärem Material, wenn es durch DNA-Rekombinationstechniken produziert wird, oder von chemischen Vorstufen oder andern Chemikalien, wenn es chemisch synthetisiert wird. Der Begriff "im wesentlichen frei von zellulärem Material" umfasst Desaturase-Präparationen, in denen das Protein von zellulären Komponenten der Zellen, in denen es natürlich oder rekombinant produziert wird, getrennt ist. Bei einer Ausführungsform umfasst der Ausdruck "im wesentlichen frei von zellulärem Material" Desaturase-Präparationen mit weniger als etwa 30 % (bezogen auf das Trockengewicht) nicht-Desaturase (hier auch als "verunreinigtes Protein" bezeichnet), stärker bevorzugt weniger als etwa 20 % nicht-Desaturase, noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10 % nicht-Desaturase und am stärksten bevorzugt weniger als etwa

59

- 5 % nicht-Desaturase. Wenn die Desaturase oder ein biologisch aktiver Teil davon rekombinant hergestellt worden ist, ist sie/er auch im wesentlichen frei von Kulturmedium, d.h. das Kulturmedium macht weniger als etwa 20 %, stärker bevorzugt weniger als etwa 10 % und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5 % des Volumens der Proteinpräparation aus. Der Begriff "im wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien" umfasst Desaturase-Präparationen, in denen das Protein von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien getrennt ist, die an der Synthese des Proteins beteiligt sind. Bei einer Ausführungsform umfasst der Begriff "im wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien" Desaturase-Präparationen mit weniger als etwa 30 % (bezogen auf das Trockengewicht) chemischen Vorstufen oder nicht-Desaturase-Chemikalien, stärker bevorzugt weniger als etwa 20 % chemischen Vorstufen oder nicht-Desaturase-Chemikalien, noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10 % chemischen Vorstufen oder nicht-Desaturase-Chemikalien und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5 % chemischen Vorstufen oder nicht-Desaturase-Chemikalien. Bei bevorzugten Ausführungsformen weisen isolierte Proteine oder biologisch aktive Teile davon keine verunreinigenden Proteine aus dem gleichen Organismus auf, aus dem die Desaturase stammt. Diese Proteine werden gewöhnlich durch rekombinante Expression zum Beispiel *Phaeodactylum tricornutum*-Desaturase in Pflanzen wie *Physcomitrella patens* bzw. o.g. oder Mikroorganismen, beispielsweise Bakterien, wie *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *C. glutamicum*, Pilzen, wie *Mortierella*, Hefe, wie *Saccharomyces*, oder Ciliaten wie *Colpidium* oder Algen wie *Phaeodactylum* hergestellt.
- Eine erfindungsgemäße isolierte Desaturase oder ein Teil davon kann auch am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phaeodactylum tricornutum* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen. Bei bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Protein oder der Teil davon eine Aminosäuresequenz, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 ist, dass das Protein oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phaeodactylum tricornutum* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen, beibehält. Der Teil des Proteins ist vorzugsweise ein biologisch aktiver Teil, wie hier beschrieben. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat eine erfindungsgemäße Desaturase eine der in SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 12 gezeigten Aminosäuresequenzen. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat die Desaturase eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die, zum Beispiel unter stringenten Bedingungen, an eine Nukleotidsequenz der

SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 hybridisiert. Bei noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat die Desaturase eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 5 70 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder noch homologer zu einer der Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 18 ist. Die erfindungsgemäße bevorzugte Desaturase besitzt vorzugsweise auch mindestens 10 eine der hier beschriebenen Desaturase-Aktivitäten. Zum Beispiel umfasst eine erfindungsgemäße bevorzugte Desaturase eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die, zum Beispiel unter stringenten Bedingungen, an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 11 hybridisiert und am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phaeodactylum tri-* 15 *cornutum* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann oder eine Doppelbindung in eine Fettsäure mit ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen und einer Kettenlänge von C₁₈, C₂₀ oder C₂₂ einführt.

20

Bei anderen Ausführungsformen ist die Desaturase im wesentlichen homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 und behält die funktionelle Aktivität des Proteins einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 bei, ihre Aminosäuresequenz 25 unterscheidet sich jedoch aufgrund von natürlicher Variation oder Mutagenese, wie eingehend im obigen Unterabschnitt I beschrieben. Bei einer weiteren Ausführungsform ist die Desaturase folglich ein Protein, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 % und 30 stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder noch homologer zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 ist und zumindest eine der hier beschriebenen Desaturase-Aktivitäten aufweist. Bei einer 35 anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung ein vollständiges *Phaeodactylum tricornutum*-Protein, das im wesentlichen homolog zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 ist.

40 Biologisch aktive Teile einer Desaturase umfassen Peptide, umfassend Aminosäuresequenzen, die von der Aminosäuresequenz einer Desaturase hergeleitet sind, z.B. eine in SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 gezeigte Aminosäuresequenz oder die Aminosäuresequenz eines Proteins, das zu einer Desaturase homolog ist, welche 45 weniger Aminosäuren als die Vollängen-Desaturase oder das Vollängenprotein aufweisen, das zu einer Desaturase homolog ist, und zumindest eine Aktivität einer Desaturase aufweisen.

61

Gewöhnlich umfassen biologisch aktive Teile (Peptide, z.B. Peptide, die zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 oder mehr Aminosäuren lang sind) eine Domäne oder ein Motiv mit mindestens einer Aktivität einer Desaturase.

- 5 Überdies können andere biologisch aktive Teile, in denen andere Bereiche des Proteins deletiert sind, durch rekombinante Techniken hergestellt und bezüglich einer oder mehrerer der hier beschriebenen Aktivitäten untersucht werden. Die biologisch aktiven Teile einer Desaturase umfassen vorzugsweise ein/eine
- 10 oder mehrere ausgewählte Domänen/Motive oder Teile davon mit biologischer Aktivität.

- Desaturasen werden vorzugsweise durch DNA-Rekombinationstechniken hergestellt. Zum Beispiel wird ein das Protein kodierendes
- 15 Nukleinsäuremolekül in einen Expressionsvektor (wie vorstehend beschrieben) kloniert, der Expressionsvektor wird in eine Wirtszelle (wie vorstehend beschrieben) eingebracht, und die Desaturase wird in der Wirtszelle exprimiert. Die Desaturase kann dann durch ein geeignetes Reinigungsschema mittels Standard-
- 20 Proteinreinigungstechniken aus den Zellen isoliert werden. Alternativ zur rekombinanten Expression kann eine Desaturase, ein -Polypeptid, oder -Peptid mittels Standard-Peptidsynthesetechniken chemisch synthetisiert werden. Überdies kann native Desaturase aus Zellen (z.B. Endothelzellen) z.B. unter Verwendung
- 25 eines Anti-Desaturase-Antikörpers isoliert werden, der durch Standardtechniken produziert werden kann, wobei eine erfindungsgemäße Desaturase oder ein Fragment davon verwendet wird.

- Die Erfindung stellt auch chimäre Desaturase-Proteine oder
- 30 Desaturase-Fusionsproteine bereit. Wie hier verwendet, umfasst ein "chimäres Desaturase-Protein" oder "Desaturase-Fusionsprotein" ein Desaturase-Polypeptid, das funktionsfähig an ein nicht-Desaturase-Polypeptid gebunden ist. Ein "Desaturase-Polypeptid" betrifft ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, die
- 35 einer Desaturase entspricht, wohingegen ein "nicht-Desaturase-Polypeptid" ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz betrifft, die einem Protein entspricht, das im wesentlichen nicht homolog zu der Desaturase ist, z.B. ein Protein, das sich von der Desaturase unterscheidet und aus dem gleichen oder einem
- 40 anderen Organismus stammt. Innerhalb des Fusionsproteins soll der Begriff "funktionsfähig verbunden" bedeuten, dass das Desaturase-Polypeptid und das nicht-Desaturase-Polypeptid so miteinander fusioniert sind, dass beide Sequenzen die vorhergesagte, der verwendeten Sequenz zugeschriebene Funktion
- 45 erfüllen. Das nicht-Desaturase-Polypeptid kann an den N-Terminus oder den C-Terminus des Desaturase-Polypeptids fusioniert sein. Bei einer Ausführungsform ist das Fusionsprotein zum Beispiel

- ein GST-Desaturase-Fusionsprotein, bei dem die Desaturase-Sequenzen an den C-Terminus der GST-Sequenzen fusioniert sind. Diese Fusionsproteine können die Reinigung der rekombinanten Desaturasen erleichtern. Bei einer weiteren Ausführungsform ist
- 5 das Fusionsprotein eine Desaturase, die eine heterologe Signalsequenz an ihrem N-Terminus aufweist. In bestimmten Wirtszellen (z.B. Säuger-Wirtszellen) kann die Expression und/oder Sekretion einer Desaturase durch Verwendung einer heterologen Signalsequenz gesteigert werden.
- 10 Ein erfindungsgemäßes chimäres Desaturase-Protein oder Desaturase-Fusionsprotein wird durch Standard-DNA-Rekombinationstechniken hergestellt. Zum Beispiel werden DNA-Fragmente, die unterschiedliche Polypeptidsequenzen kodieren, gemäß herkömm-
- 15 licher Techniken im Leseraster aneinander ligiert, indem beispielsweise glatte oder überhängende Enden zur Ligation, Restriktionsenzymsspaltung zur Bereitstellung geeigneter Enden, Auffüllen kohäsiver Enden, wie erforderlich, Behandlung mit alkalischer Phosphatase, um ungewollte Verknüpfungen zu ver-
- 20 meiden, und enzymatische Ligation eingesetzt werden. Bei einer weiteren Ausführungsform kann das Fusionsgen durch herkömmliche Techniken, einschließlich DNA-Syntheseautomaten, synthetisiert werden. Alternativ kann eine PCR-Amplifizierung von Genfragmenten unter Verwendung von Ankerprimern durchgeführt werden, die
- 25 komplementäre Überhänge zwischen aufeinanderfolgenden Genfragmenten erzeugen, die anschließend miteinander hybridisiert und reamplifiziert werden können, so dass eine chimäre Gensequenz erzeugt wird (siehe zum Beispiel Current Protocols in Molecular Biology, Hrsgb. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992). Über-
- 30 dies sind viele Expressionsvektoren kommerziell erhältlich, die bereits eine Fusionseinheit (z.B. ein GST-Polypeptid) kodieren. Eine Desaturase-kodierende Nukleinsäure kann in einen solchen Expressionsvektor kloniert werden, so dass die Fusionseinheit im Leseraster mit dem Desaturase-Protein verbunden ist.
- 35 Homologe der Desaturase können durch Mutagenese, z.B. durch spezifische Punktmutation oder Verkürzung der Desaturase, erzeugt werden. Der Begriff "Homologe", wie hier verwendet, betrifft eine variante Form der Desaturase, die als Agonist oder Antagonist
- 40 der Desaturase-Aktivität wirkt. Ein Agonist der Desaturase kann im wesentlichen die gleiche Aktivität wie die oder einen Teil der biologischen Aktivitäten der Desaturase beibehalten. Ein Antagonist der Desaturase kann eine oder mehrere Aktivitäten der natürlich vorkommenden Form der Desaturase durch zum Beispiel
- 45 kompetitive Bindung an ein stromabwärts oder -aufwärts gelegenes Element der Stoffwechselkaskade für Zellmembrankomponenten, welche die Desaturase umfasst, oder durch Bindung an eine

Desaturase, welche den Transport von Verbindungen über Zellmembranen vermittelt, hemmen, wodurch die Translokation gehemmt wird.

Bei einer alternativen Ausführungsform können Homologe der

- 5 Desaturase durch Sichten kombinatorischer Banken von Mutanten, z.B. Verkürzungsmutanten, der Desaturase hinsichtlich Desaturase-Agonisten- oder -Antagonisten-Aktivität identifiziert werden. Bei einer Ausführungsform wird eine variierte Bank von Desaturase-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäure-
- 10 ebene erzeugt und durch eine variierte Genbank kodiert. Eine variierte Bank von Desaturase-Varianten kann z.B. durch enzymatische Ligation eines Gemisches von synthetischen Oligonukleotiden in Gensequenzen hergestellt werden, so dass sich ein degenerierter Satz potentieller Desaturase-Sequenzen als
- 15 individuelle Polypeptide oder alternativ als Satz größerer Fusionsproteine (z.B. für das Phage-Display), die diesen Satz von Desaturase-Sequenzen enthalten, exprimieren lässt. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller Desaturase-Homologen aus einer degenerierten
- 20 Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt und das synthetische Gen dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Satzes von Genen ermöglicht die
- 25 Bereitstellung sämtlicher Sequenzen, die den gewünschten Satz an potentiellen Desaturase-Sequenzen kodieren, in einem Gemisch. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind im Fachgebiet bekannt (siehe z.B. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura
- 30 et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

Zusätzlich können Banken von Desaturase-Fragmenten zur Herstellung einer variierten Population von Desaturase-Fragmenten

- 35 für das Sichten und für die anschließende Selektion von Homologen einer Desaturase verwendet werden. Bei einer Ausführungsform kann eine Bank von Fragmenten der kodierenden Sequenz durch Behandeln eines doppelsträngigen PCR-Fragmentes einer kodierenden Desaturase-Sequenz mit einer Nuklease unter Bedingungen, unter
- 40 denen Doppelstrangbrüche nur etwa einmal pro Molekül erfolgen, Denaturieren der doppelsträngigen DNA, Renaturieren der DNA unter Bildung doppelsträngiger DNA, welche Sense/Antisense-Paare von verschiedenen Produkten mit Doppelstrangbrüchen umfassen kann, Entfernen einzelsträngiger Abschnitte aus neu gebildeten Duplices
- 45 durch Behandlung mit S1-Nuklease und Ligieren der resultierenden Fragmentbank in einen Expressionsvektor erzeugt werden. Mit diesem Verfahren kann eine Expressionsbank hergeleitet werden,

die N-terminale, C-terminale und interne Fragmente der Desaturase verschiedener Größen kodiert.

Im Fachgebiet sind mehrere Techniken für das Sichten von Gen-
5 produkten in kombinatorischen Banken, die durch Punktmutationen
oder Verkürzung hergestellt worden sind, und für das Sichten von
cDNA-Banken nach Genprodukten mit einer ausgewählten Eigenschaft
bekannt. Diese Techniken lassen sich an das schnelle Sichtung
10 der Genbanken anpassen, die durch kombinatorische Mutagenese
von Desaturase-Homologen erzeugt worden sind. Die am häufigsten
verwendeten Techniken zum Sichtung großer Genbanken, die einer
Analyse mit hohem Durchsatz unterworfen werden können, um-
fassen gewöhnlich das Klonieren der Genbank in replizierbare
15 Expressionsvektoren, Transformieren von geeigneten Zellen mit der
resultierenden Vektorenbank und Exprimieren der kombinatorischen
Gene unter Bedingungen, unter denen der Nachweis der gewünschten
Aktivität die Isolation des Vektors, der das Gen kodiert, dessen
Produkt nachgewiesen wurde, erleichtert. Recursive-Ensemble-Muta-
20 genese (REM), eine neue Technik, die die Häufigkeit funktioneller
Mutanten in den Banken erhöht, kann in Kombination mit den
Sichtungstests zur Identifikation von Desaturase-Homologen ver-
wendet werden (Arkin und Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering
6(3):327-331).

25 Eine weitere bekannte Technik zur Veränderung von katalytischen
Eigenschaften von Enzymen bzw. deren codierenden Genen ist
das "Gen-Shuffling" (siehe z.B. in Stemmer, PNAS 1994, 91:
10747-10751, WO9720078 oder WO9813487), das eine Kombination von
30 Genfragmenten darstellt, wobei diese Neukombination zusätzlich
noch durch fehlerhafte Polymerasekettenreaktionen variiert werden
kann und somit eine hohe zu testende Sequenzdiversität schafft.
Voraussetzung für den Einsatz eines solchen Ansatzes ist jedoch
ein geeignetes Screeningsystem, um die erstellte Gendiversität
35 auf Funktionalität zu überprüfen.

Insbesondere für die Sichtung von Desaturaseaktivitäten
ist ein Sichtungsverfahren Voraussetzung, das PUFA-abhängig
Enzymaktivität(en) erfaßt. Bzgl. Desaturaseaktivitäten mit
40 Spezifität für PUFAs kann man in *Mucor-Species*, die durch
bekannte Transformationsverfahren mit gewünschten Genkonstrukten
transformierbar sind, die Toxizität von Arachidonsäure in An-
wesenheit eines toxischen Metaboliten (hier: Salicylsäure oder
Salicylsäurederivate) nutzen (Eroshin et al., Mikrobiologiya,
45 Vol. 65, No.1 1996, Seiten 31-36), um eine wachstumsbasierte
Erstsichtung durchzuführen. Resultierende Klone können dann einer
Analyse ihrer Lipidinhaltstoffe mittels Gaschromatographie und

65

Massenspektroskopie unterzogen werden, um Edukte und Produkte in Art und Menge zu erfassen.

Bei einer weiteren Ausführungsform können Tests auf Zellbasis
5 zur Analyse einer variierten Desaturase-Bank unter Verwendung von weiteren im Fachgebiet bekannten Verfahren ausgenutzt werden.

E. Erfindungsgemäße Verwendungen und Verfahren

- 10 Die hier beschriebenen Nukleinsäuremoleküle, Proteine, Protein-homologen, Fusionsproteine, Primer, Vektoren und Wirtszellen können bei einem oder mehreren der nachstehenden Verfahren verwendet werden: Identifikation von *Phaeodactylum* und verwandten Organismen, Kartierung der Genome von Organismen, die mit
15 *Phaeodactylum tricornutum* verwandt sind, Identifikation und Lokalisierung von *Phaeodactylum tricornutum*-Sequenzen von Interesse, Evolutionsstudien, Bestimmung von Desaturase-Proteinbereichen, die für die Funktion notwendig sind, Modulation einer Desaturase-Aktivität; Modulation des Stoffwechsels einer oder
20 mehrerer Zellmembrankomponenten; Modulation des Transmembran-transportes einer oder mehrerer Verbindungen sowie Modulation der zellulären Produktion einer gewünschten Verbindung, wie einer Feinchemikalie. Die erfindungsgemäßen Desaturase-Nukleinsäuremoleküle haben eine Vielzahl von Verwendungen. Sie können
25 zunächst zur Identifikation eines Organismus als *Phaeodactylum tricornutum* oder als naher Verwandter davon verwendet werden. Sie können auch zur Identifikation des Vorliegens von *Phaeodactylum tricornutum* oder eines Verwandten davon in einer Mischpopulation von Mikroorganismen verwendet werden. Die Erfindung stellt die
30 Nukleinsäuresequenzen einer Reihe von *Phaeodactylum tricornutum*-Genen bereit; durch Sondieren der extrahierten genomischen DNA einer Kultur einer einheitlichen oder gemischten Population von Mikroorganismen unter stringenten Bedingungen mit einer Sonde, die einen Bereich eines *Phaeodactylum tricornutum* -Gens oder von
35 Teilen davon überspannt, das für diesen Organismus einzigartig ist, kann man bestimmen, ob dieser Organismus vorliegt. *Phaeodactylum tricornutum* selbst werden zur kommerziellen Produktion mehrfach ungesättigter Säuren verwendet und eignen darüber hinaus zur PUFA-Produktion auch in anderen Organismen insbesondere wenn
40 erreicht werden soll, dass resultierende PUFAs auch in die Triacylglycerolfraktion eingebaut werden sollen.

Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle als Marker für spezifische Bereiche des Genoms dienen.
45 Dies ist nicht nur zur Kartierung des Genoms, sondern auch für funktionelle *Phaeodactylum tricornutum*-Proteinen geeignet. Zur Identifikation des Genombereichs, an den ein bestimmtes DNA-

66

bindendes Protein von *Phaeodactylum tricornutum* bindet, könnte das *Phaeodactylum tricornutum*-Genom zum Beispiel gespalten werden und die Fragmente mit dem DNA-bindenden Protein inkubiert werden. Diejenigen, die das Protein binden, können zusätzlich mit den

5 erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen, vorzugsweise mit leicht nachweisbaren Markierungen, sondiert werden; die Bindung eines solchen Nukleinsäuremoleküls an das Genomfragment ermöglicht die Lokalisierung des Fragments auf der Genomkarte von *Phaeodactylum tricornutum* und erleichtert, wenn dies mehrmals mit unterschied-

10 lichen Enzymen durchgeführt wird, eine rasche Bestimmung der Nukleinsäuresequenz, an die das Protein bindet. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem ausreichend homolog zu den Sequenzen verwandter Arten sein, dass diese Nukleinsäuremoleküle als Marker für die Konstruktion einer genomischen Karte

15 bei verwandten Pilzen oder Algen dienen können.

Die erfindungsgemäßen Desaturase-Nukleinsäuremoleküle eignen sich auch für Evolutions- und Proteinstruktur-Untersuchungen. Die Stoffwechsel- und Transportprozesse, an denen die er-

20 findungsgemäßen Moleküle beteiligt sind, werden von vielen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen genutzt; durch Vergleich der Sequenzen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle mit solchen, die ähnliche Enzyme aus anderen Organismen kodieren, kann der Evolutions-Verwandtschaftsgrad der Organismen

25 bestimmt werden. Entsprechend ermöglicht ein solcher Vergleich die Bestimmung, welche Sequenzbereiche konserviert sind und welche nicht, was bei der Bestimmung von Bereichen des Proteins hilfreich sein kann, die für die Enzymfunktion essentiell sind. Dieser Typ der Bestimmung ist für Proteinengineering-Unter-

30 suchungen wertvoll und kann einen Hinweis darauf geben, wieviel Mutagenese das Protein tolerieren kann, ohne die Funktion zu verlieren.

Die Manipulation der erfindungsgemäßen Desaturase-Nukleinsäure-

35 moleküle kann zur Produktion von Desaturasen mit funktionellen Unterschieden zu den Wildtyp-Desaturasen führen. Die Effizienz oder Aktivität dieser Proteine kann verbessert sein, sie können in größeren Anzahlen als gewöhnlich in der Zelle zugegen sein, oder ihre Effizienz oder Aktivität kann verringert sein. Ver-

40 besserte Effizienz oder Aktivität bedeutet beispielsweise, dass das Enzym eine höhere Selektivität und/oder Aktivität, vorzugsweise eine mindestens 10 % höhere, besonders bevorzugt eine mindestens 20 % höhere Aktivität, ganz besonders bevorzugt eine mindestens 30 % höhere Aktivität als das ursprüngliche Enzym

45 aufweist.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung einer erfindungsgemäßen Desaturase die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie, welche ein solches verändertes Protein enthält, direkt beeinflussen

5 kann. Die Gewinnung von Feinchemikalien-Verbindungen aus Kulturen von Ciliaten, Algen oder Pilzen im großen Maßstab ist signifikant verbessert, wenn die Zelle die gewünschten Verbindungen sezerniert, da diese Verbindungen aus dem Kulturmedium (im Gegensatz zur Extraktion aus der Masse der gezüchteten Zellen) leicht

10 gereinigt werden können. Ansonsten lässt sich die Reinigung verbessern, wenn die Zelle in vivo Verbindungen in einem spezialisierten Kompartiment mit einer Art Konzentrationsmechanismus speichert. Bei Pflanzen, die Desaturasen exprimieren, kann ein gesteigerter Transport zu besserer Verteilung innerhalb des

15 Pflanzengewebes und der -organe führen. Durch Vergrößern der Anzahl oder der Aktivität von Transportermolekülen, welche Feinchemikalien aus der Zelle exportieren, kann es möglich sein, die Menge der produzierten Feinchemikalie, die im extrazellulären Medium zugegen ist, zu steigern, wodurch Ernte und Reinigung oder

20 bei Pflanzen eine effizientere Verteilung erleichtert werden. Zur effizienten Überproduktion einer oder mehrerer Feinchemikalien sind dagegen erhöhte Mengen an Cofaktoren, Vorläufermolekülen und Zwischenverbindungen für die geeigneten Biosynthesewege erforderlich. Durch Vergrößern der Anzahl und/oder der Aktivität von

25 Transporterproteinen, die am Import von Nährstoffen, wie Kohlenstoffquellen (d.h. Zuckern), Stickstoffquellen (d.h. Aminosäuren, Ammoniumsalzen), Phosphat und Schwefel, beteiligt sind, kann man die Produktion einer Feinchemikalie aufgrund der Beseitigung aller Einschränkungen des Nährstoffangebots beim Biosyntheseprozess verbessern. Fettsäuren, wie PUFAs, und Lipide, die PUFAs

30 enthalten, sind selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch Optimieren der Aktivität oder Erhöhen der Anzahl einer oder mehrerer erfindungsgemäßer Desaturasen, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Stören der Aktivität einer oder mehrerer Desaturasen, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann man somit die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmoleküle in Ciliaten, Algen, Pflanzen, Pilzen, Hefen oder anderen Mikroorganismen steigern.

35

40 Die Manipulation eines oder mehrerer erfindungsgemäßer Desaturase-Gene kann ebenfalls zu Desaturasen mit veränderten Aktivitäten führen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter Feinchemikalien aus Algen, Pflanzen, Ciliaten oder

45 Pilzen indirekt beeinflussen. Die normalen biochemischen Stoffwechselprozesse führen z.B. zur Produktion einer Vielzahl an Abfallprodukten (z.B. Wasserstoffperoxid und andere reaktive

- Sauerstoffspezies), die diese Stoffwechselprozesse aktiv stören können (z.B. nitriert Peroxynitrit bekanntlich Tyrosin-Seitenketten, wodurch einige Enzyme mit Tyrosin im aktiven Zentrum inaktiviert werden (Groves, J.T. (1999) Curr. Opin. Chem. Biol. 3(2);226-235)). Diese Abfallprodukte werden zwar üblicherweise ausgeschieden, aber die zur fermentativen Produktion im großen Maßstab verwendeten Zellen werden für die Überproduktion einer oder mehrerer Feinchemikalien optimiert und können somit mehr Abfallprodukte produzieren als für eine Wildtypzelle üblich.
- 10 Durch Optimieren der Aktivität einer oder mehrerer erfindungsgemäßer Desaturasen, die am Export von Abfallmolekülen beteiligt sind, kann man die Lebensfähigkeit der Zelle verbessern und eine effiziente Stoffwechselaktivität aufrechterhalten. Auch das Vorliegen hoher intrazellulärer Mengen der gewünschten Fein-
- 15 chemikalie kann tatsächlich für die Zelle toxisch sein, so dass man durch Steigern der Fähigkeit der Zelle zur Sekretion dieser Verbindungen die Lebensfähigkeit der Zelle verbessern kann.

- Die erfindungsgemäßen Desaturasen können ferner so manipuliert
- 20 sein, dass die relativen Mengen verschiedener Lipid- und Fettsäuremoleküle verändert werden. Dies kann eine entscheidende Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften hat, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die
- 25 Membranfluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport von Molekülen über die Membran beeinflussen, was, wie vorstehend erläutert, den Export von Abfallprodukten oder der produzierten Feinchemikalie oder den Import notwendiger Nährstoffe modifizieren kann. Diese Änderungen
- 30 der Membranfluidität können auch die Integrität der Zelle entscheidend beeinflussen; Zellen mit vergleichsweise schwächeren Membranen sind anfälliger gegenüber abiotischen und biotischen Stressbedingungen, welche die Zelle beschädigen oder abtöten können. Durch Manipulieren von Desaturasen, die an der Produktion
- 35 von Fettsäuren und Lipiden für den Membranaufbau beteiligt sind, so dass die resultierende Membran eine Membranzusammensetzung hat, die für die in den Kulturen, die zur Produktion von Feinchemikalien verwendet werden, herrschenden Umweltbedingungen empfänglicher sind, sollte ein größerer Anteil der Zellen über-
- 40 leben und sich vermehren. Größere Mengen an produzierenden Zellen sollten sich in größeren Ausbeuten, höherer Produktion oder Effizienz der Produktion der Feinchemikalie aus der Kultur manifestieren.

- 45 Die vorstehend genannten Mutagenesestrategien für Desaturasen, die zu erhöhten Ausbeuten einer Feinchemikalie führen sollen, sollen nicht beschränkend sein; Variationen dieser Strategien

- sind dem Fachmann leicht ersichtlich. Unter Verwendung dieser Mechanismen und mithilfe der hier offenbarten Mechanismen können die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle zur Erzeugung von Algen, Ciliaten, Pflanzen, Tieren, Pilzen oder
- 5 anderen Mikroorganismen, wie *C. glutamicum*, verwendet werden, die mutierte Desaturase-Nukleinsäure- und Proteinmoleküle exprimieren, so dass die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung verbessert wird. Diese gewünschte Verbindung kann ein beliebiges natürliches Produkt von
- 10 Algen, Ciliaten, Pflanzen, Tieren, Pilzen oder Bakterien sein, welches die Endprodukte von Biosynthesewegen und Zwischenprodukte natürlich vorkommender Stoffwechselwege umfasst, sowie Moleküle, die im Stoffwechsel dieser Zellen nicht natürlich vorkommen, die jedoch von den erfindungsgemäßen Zellen produziert werden.
- 15 Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist ein Verfahren zur Produktion von PUFAs, wobei das Verfahren das Züchten eines Organismus, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt oder einen erfindungsgemäßen
- 20 Vektor umfasst, welche ein Polypeptid kodieren, das C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül um mindestens zwei Kohlenstoffatome unter Bedingungen, unter denen PUFAs in dem Organismus produziert werden, verlängert, umfasst. Durch dieses Verfahren hergestellte
- 25 PUFAs lassen sich durch Ernten der Organismen entweder aus der Kultur, in der sie wachsen, oder von dem Feld, Aufbrechen und/oder Extrahieren des geernteten Materials mit einem organischen Lösungsmittel isolieren. Aus diesem Lösungsmittel kann das Öl, das Lipide, Phospholipide, Sphingolipide, Glyco-
- 30 lipide, Triacylglycerine und/oder freie Fettsäuren mit höherem Gehalt an PUFAs enthält, isoliert werden. Durch basische oder saure Hydrolyse der Lipide, Phospholipide, Sphingolipide, Glycolipide, Triacylglycerine können die freien Fettsäuren mit höherem Gehalt an PUFAs isoliert werden. Ein höherer Gehalt an PUFAs
- 35 bedeutet mindestens 5 %, vorzugsweise 10 %, besonders bevorzugt 20 %, ganz besonders bevorzugt 40 % mehr PUFAs als der ursprüngliche Organismus, der keine zusätzliche Nukleinsäure, die die erfindungsgemäße Desaturase kodiert, besitzt.
- 40 Vorzugsweise sind die durch dieses Verfahren produzierten PUFAs C₁₈- oder C₂₀₋₂₂-Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise drei, vier, bei Kombination mit einer weiteren Elongasen und einer Δ -4 Desaturase fünf oder sechs Doppelbindungen. Diese C₁₈- oder C₂₀₋₂₂-Fettsäure-
- 45 moleküle lassen sich aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids oder einer freien Fettsäure isolieren. Geeignete Organismen sind

70

beispielsweise die vorstehend erwähnten. Bevorzugte Organismen sind transgene Pflanzen.

5 Eine erfindungsgemäße Ausführungsform sind Öle, Lipide oder Fettsäuren oder Fraktionen davon, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt worden sind, besonders bevorzugt Öl, Lipid oder eine Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs umfassen und von transgenen Pflanzen herrühren.

10 Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung des Öls, Lipids oder der Fettsäurezusammensetzung in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist ein Verfahren zur
15 Identifikation eines Antagonisten oder Agonisten von Desaturasen, umfassend

- a) in Kontaktbringen der Zellen, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung exprimieren, mit einem Kandidatenstoff;
20
- b) Testen der Desaturaseaktivität;
- c) Vergleichen der Desaturaseaktivität mit einer Standardaktivität in Abwesenheit des Kandidatenstoffs, wobei ein Anstieg der Desaturaseaktivität über den Standard anzeigt, daß der Kandidatenstoff ein Agonist und eine Verringerung der Desaturaseaktivität anzeigt, daß der Kandidatenstoff ein Antagonist ist.
25

30

Der genannte Kandidatenstoff kann ein chemisch synthetisierter oder mikrobiologisch produzierter Stoff sein und z.B. in Zell-extrakten von z.B. Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen auftreten. Weiterhin kann der genannte Stoff zwar im Stand der
35 Technik bekannt sein, aber bisher nicht bekannt sein als die Aktivität der Desaturasen steigernd oder reprimierend. Das Reaktionsgemisch kann ein zellfreier Extrakt sein oder eine Zelle oder Zellkultur umfassen. Geeignete Methoden sind dem Fachmann bekannt und werden z.B. allgemein beschrieben in Alberts, Molecular Biology the cell, 3rd Edition (1994), z.B. Kapitel 17. Die
40 genannten Stoffe können z.B. zu dem Reaktionsgemisch oder dem Kulturmedium zugegeben werden oder den Zellen injiziert werden oder auf eine Pflanze gesprüht werden.

45 Wenn eine Probe, die ein nach der erfindungsgemäßen Methode aktiven Stoff beinhaltet, identifiziert wurde, dann ist es entweder möglich, den Stoff direkt von der ursprünglichen Probe zu

- isolieren oder man kann die Probe in verschiedene Gruppen teilen, z.B. wenn sie aus einer Vielzahl von verschiedenen Komponenten besteht, um so die Zahl der verschiedenen Substanzen pro Probe zu reduzieren und dann das erfindungsgemäße Verfahren mit einer solchen "Unterprobe" der ursprünglichen Probe zu wiederholen. 5 Abhängig von der Komplexität der Probe können die oben beschriebenen Schritte mehrmals wiederholt werden, vorzugsweise bis die gemäß der erfindungsgemäßen Methode identifizierte Probe nur noch eine geringe Anzahl von Substanzen oder nur noch eine Substanz 10 umfaßt. Vorzugsweise wird der gemäß der erfindungsgemäßen Methode identifizierte Stoff oder Derivate davon weiter formuliert, so, daß er für die Anwendung in der Pflanzenzüchtung oder Pflanzenzell- oder Gewebekultur geeignet ist.
- 15 Die Stoffe, die gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren getestet und identifiziert wurden, können sein: Expressionsbibliotheken, z.B. cDNA-Expressionsbibliotheken, Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Antikörper, kleine organische Stoffe, Hormone, PNAs oder ähnliches (Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell. 20 83 (1995), 237-245; Gibbs, Cell. 79 (1994), 193-198 und darin zitierte Referenzen). Diese Stoffe könne auch funktionelle Derivate oder Analogon der bekannten Inhibitoren oder Aktivatoren sein. Verfahren zur Herstellung von chemischen Derivaten oder Analogon sind dem Fachmann bekannt. Die genannten Derivate und 25 Analogon können gemäß Verfahren nach dem Stand der Technik getestet werden. Weiterhin kann computergestütztes Design oder Peptidomimetics zur Herstellung geeigneter Derivate und Analogon verwendet werden. Die Zelle oder das Gewebe, die/das für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden kann, ist vorzugsweise eine erfindungsgemäße Wirtszelle, Pflanzenzelle oder ein 30 Pflanzengewebe, wie in den oben genannten Ausführungsformen beschrieben.

- Entsprechend betrifft die vorliegende Erfindung auch einen 35 Stoff, der gemäß den vorstehenden erfindungsgemäßen Verfahren identifiziert wurde. Der Stoff ist z.B. ein Homolog der erfindungsgemäßen Desaturasen. Homologe der Desaturasen können durch Mutagenese, z.B. durch Punktmutation oder Deletion der Desaturasen, erzeugt werden. Hierin verwendet wird der Begriff 40 "Homolog" als eine variante Form der Desaturasen, die als Agonist oder Antagonist für die Aktivität der Desaturasen wirkt. Ein Agonist kann die im wesentlichen gleiche oder einen Teil der biologischen Aktivität der Desaturasen haben. Ein Antagonist der Desaturasen kann eine oder mehr Aktivitäten der natürlich vor- 45 kommenden Formen der Desaturasen inhibieren, z.B. kompetitiv an ein *Downstream* oder *Upstream* gelegenes Mitglied der Fettsäuresynthese-Stoffwechselwege, die die Desaturasen einschließen,

72

binden oder an Desaturasen binden und dabei die Aktivität reduzieren oder inhibieren.

Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Antikörper
5 oder ein Fragment davon, wie sie hierin beschrieben werden, der die Aktivität der erfindungsgemäßen Desaturasen inhibiert.

Bei einem Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Anti-
körper, der spezifisch den erfindungsgemäßen oben beschriebenen
10 Agonisten oder Antagonisten erkennt bzw. bindet.

Ein weiterer Aspekt betrifft eine Zusammensetzung, die den Anti-
körper, den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten
Stopp oder das Antisense-Molekül umfaßt.

15

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende
Erfindung ein Kit, umfassend die erfindungsgemäße Nukleinsäure,
das erfindungsgemäße Genkonstrukt, die erfindungsgemäße Amino-
säuresequenz, das erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuremolekül,
20 den erfindungsgemäßen Antikörper und/oder Zusammensetzung, einen
Antagonisten oder Agonisten, der nach dem erfindungsgemäßen Ver-
fahren hergestellt wurde, und/oder erfindungsgemäße Öle, Lipide
und/oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon. Ebenso kann das
Kit die erfindungsgemäßen Wirtszellen, Organismen, Pflanzen
25 oder Teile davon, erntbare Teile der erfindungsgemäßen Pflanzen
oder Vermehrungsmaterial oder aber auch den erfindungsgemäßen
Antagonisten oder Agonisten umfassen. Die Komponenten des Kits
der vorliegenden Erfindung können in geeigneten Containern, bei-
spielsweise mit oder in Puffern oder anderen Lösungen verpackt
30 sein. Ein oder mehr der genannten Komponenten können in ein und
demselben Container verpackt sein. Zusätzlich oder alternativ
können ein oder mehr der genannten Komponenten z.B. auf einer
festen Oberfläche adsorbiert sein, z.B. Nitrozellulosefilter,
Glasplatten, Chips, Nylonmembranen oder Mikrotiterplatten. Das
35 Kit kann für jede der hierin beschriebenen Methoden und Aus-
führungsformen verwendet werden, z.B. für die Produktion von
Wirtszellen, transgenen Pflanzen, zur Detektion von homologen
Sequenzen, zur Identifikation von Antagonisten oder Agonisten
usw. Weiterhin kann das Kit Anleitungen für die Verwendung des
40 Kits für eine der genannten Anwendungen enthalten.

Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter
veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefaßt werden
sollten. Der Inhalt sämtlicher in dieser Patentanmeldung
45 zitierten Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und

73

veröffentlichten Patentanmeldungen ist hier durch Bezugnahme aufgenommen.

Beispielteil

5

Beispiel 1: Allgemeine Verfahren

a) Allgemeine Klonierungsverfahren:

- 10 Klonierungsverfahren, wie beispielsweise Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrocellulose- und Nylonmembranen, Verbindung von DNA-Fragmenten, Transformation von *Escherichia coli*- und Hefe-Zellen, Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse
- 15 rekombinanter DNA, wurden durchgeführt wie beschrieben in Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) oder Kaiser, Michaelis und Mitchell (1994) "Methods in Yeast Genetics" (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-451-3). Die Transformation und Anzucht von Algen,
- 20 wie *Chlorella* oder *Phaeodactylum* werden durchgeführt wie beschrieben von El-Sheekh (1999), *Biologia Plantarum* 42:209-216; Apt et al. (1996) *Molecular and General Genetics* 252 (5):872-9.

b) Chemikalien

25

- Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn im Text nicht anders angegeben, in p. A.-Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Lösungen wurden unter Verwendung
- 30 von reinem pyrogenfreiem Wasser, im nachstehenden Text als H₂O bezeichnet, aus einer Milli-Q-Wassersystem-Wasserreinigungsanlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme und molekularbiologische Kits wurden bezogen von den Firmen AGS (Heidelberg), Amersham
- 35 (Braunschweig), Biometra (Göttingen), Boehringer (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden) und Stratagene (Amsterdam, Niederlande). Wenn nicht anders ange-
- 40 geben, wurden sie nach den Anweisungen des Herstellers verwendet.

c) Zellmaterial

Die erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuresequenzen sind im Genom eines *Phaeodactylum tricornutum* UTEX646-Stammes enthalten, 5 der über die Algensammlung der University of Texas, Austin verfügbar ist.

Phaeodactylum tricornutum wurde bei 25°C mit einem Licht/Dunkel Rhythmus von 14:10 Stunden bei 22°C und 35 microEinstein (ent- 10 spricht micromol Photonen pro Quadratmeter und Sekunde) in Glasröhren kultiviert, die von unten mit Luft begast wurden.

Als Kulturmedium für *Phaeodactylum tricornutum* wurde das f/2 Kulturmedium mit 10 % organischen Medium nach Guillard, R.R.L. 15 verwendet (1975; Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L. and Chanley, M.H. (Eds.) Culture of marine Invertebrate animals, NY Plenum Press, pp. 29-60.): Es enthält

20 995,5 ml Seewasser (artifizuell)
1 ml NaNO_3 (75 g/l), 1 ml NaH_2PO_4 (5 g/l), 1 ml Spurenelemente-
lösung, 1 ml Tris/Cl pH 8,0, 0,5 ml f/2 Vitaminlösung

Spurenelementelösung: Na_2EDTA (4,36 g/l), FeCl_3 (3,15 g/l),
25 Primäre Spurenelemente: CuSO_4 (10 g/l), ZnSO_4 (22 g/l), CoCl_2
(10 g/l), MnCl_2 (18 g/l), NaMoO_4 (6,3 g/l)
f/2 Vitaminlösung: Biotin: 10 mg/l, Thiamin 200 mg/l, Vit B12
0,1 mg/l
org-Medium: Na-Acetat (1 g/l), Glucose (6 g/l), Na-Succinat
30 (3 g/l), Bacto-Trypton (4 g/l), Hefe-Extrakt (2 g/l)

Beispiel: 2 Isolierung von Gesamt-DNA aus *Phaeodactylum tri-*
cornutum UTEX646 für Hybridisierungsexperimente

35 Die Einzelheiten der Isolierung von Gesamt-DNA betreffen die Auf-
arbeitung von Pflanzenmaterial mit einem Frischgewicht von einem
Gramm.

CTAB-Puffer: 2 % (Gew./Vol.) N-Acetyl-N,N,N-trimethylammonium-
40 bromid (CTAB); 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA.

N-Laurylsarkosin-Puffer: 10 % (Gew./Vol.) N-Laurylsarkosin;
100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA.

45 *Phaeodactylum tricornutum*-Zellmaterial wurde unter flüssigem
Stickstoff in einem Mörser verrieben, so dass ein feines Pulver
erhalten wurde, und in 2 ml-Eppendorfgefäße überführt. Das ge-

75

- frörene Pflanzenmaterial wurde dann mit einer Schicht von 1 ml Zersetzungspuffer (1 ml CTAB-Puffer, 100 ml N-Laurylsarkosin-Puffer, 20 ml β -Mercaptoethanol und 10 ml Proteinase K-Lösung, 10 mg/ml) überschichtet und eine Stunde unter kontinuierlichem
- 5 Schütteln bei 60°C inkubiert. Das erhaltene Homogenat wurde in zwei Eppendorfgeläße (2 ml) aufgeteilt und zweimal durch Schütteln mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Zur Phasentrennung wurde eine Zentrifugation bei 8000 x g und RT (= Raumtemperatur = ~ 23°C) jeweils 15 min
- 10 lang durchgeführt. Die DNA wurde dann 30 min unter Verwendung von eiskaltem Isopropanol bei -70°C gefäällt. Die gefäälte DNA wurde bei 10000 g 30 min bei 4°C sedimentiert und in 180 ml TE-Puffer (Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) resuspendiert. Zur weiteren Reinigung wurde die
- 15 DNA mit NaCl (1,2 M Endkonzentration) behandelt und erneut 30 min unter Verwendung des zweifachen Volumens an absolutem Ethanol bei -70°C gefäällt. Nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol wurde die DNA getrocknet und anschließend in 50 ml H₂O + RNase (50 mg/ml Endkonzentration) aufgenommen. Die DNA wurde über Nacht bei 4°C
- 20 gelöst und die RNase-Spaltung wurde anschließend 1 Std. bei 37°C durchgeführt. Die Aufbewahrung der DNA erfolgte bei 4°C.

Beispiel 3: Isolierung von Gesamt-RNA und poly(A)⁺-RNA aus Pflanzen und *Phaeodactylum tricornutum*

25

- Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen wie Lein und Raps etc. erfolgt nach einer bei Logemann et al beschriebenen Methode (1987, Anal. Biochem. 163, 21) isoliert. Aus Moos kann die Gesamt-RNA Protonema-Gewebe nach dem GTC-Verfahren (Reski
- 30 et al., 1994, Mol. Gen. Genet., 244:352-359) gewonnen werden.

RNA Isolierung aus *Phaeodactylum tricornutum*:

- Tiefgefrorene Algenproben (- 70°C) wurden in einem eiskaltem
- 35 Mörser unter Flüssigstickstoff zu feinem Pulver zerreiben. 2 Volumen Homogenisationsmedium (12,024 g Sorbitol, 40,0 ml 1M Tris-HCl, pH 9 (0,2 M); 12,0 ml 5 M NaCl (0,3 M), 8,0 ml 250 mM EDTA, 761,0 mg EGTA, 40,0 ml 10 % SDS wurden auf 200 ml mit H₂O aufgefüllt und der pH auf 8,5 eingestellt) und 4 Volumen Phenol
- 40 mit 0,2 % Mercaptoethanol wurden bei 40 bis 50°C unter gutem Mischen zu gefrorenem Zellpulver gegeben. Danach wurden 2 Volumen Chloroform hinzufügen und für 15 min kräftig gerührt. Es wurde 10 min bei 10000 g zentrifugiert und die wässrige Phase mit Phenol/Chloroform (2 Vol) und abschließend mit Chloroform
- 45 extrahiert.

76

Das erhaltene Volumen der wässrigen Phase wurde mit 1/20 Vol 4 M Na-Acetat (pH 6) und 1 Vol Isopropanol (eiskalt) versetzt und die Nukleinsäuren bei -20°C über Nacht (= ÜN) gefällt. Anschließend wurde 30 min bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand abgesogen. Es folgte ein Waschschrift mit 70 % EtOH und erneute Zentrifugation. Das Sediment wurde in Tris-Borat-Puffer (80 mM Tris-Borat-Puffer, 10 mM EDTA, pH 7,0) aufgenommen. Dann wurde der Überstand mit 1/3 Vol 8 M LiCl versetzt, gemischt 30 min bei 4°C inkubiert. Nach erneutem zentrifugieren wurde das Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert und das Sediment in RNase-freiem Wasser gelöst.

Die Isolierung von poly(A)⁺-RNA erfolgte unter Verwendung von Dyna Beads® (Dyna, Oslo, Finnland) nach den Anweisungen im Protokoll des Herstellers.

Nach der Bestimmung der RNA- oder poly(A)⁺-RNA-Konzentration wurde die RNA durch Zugabe von 1/10 Volumina 3 M Natriumacetat, pH 4,6, und 2 Volumina Ethanol gefällt und bei -70°C aufbewahrt.

Für die Analyse wurden jeweils 20 µg RNA in einem Formaldehydhaltigen 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylon Membranen (Hybond, Amersham) überführt. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde wie bei Amasino beschrieben durchgeführt ((1986) Anal. Biochem. 152, 304)).

Beispiel 4: Konstruktion der cDNA-Bank

Zur Konstruktion der cDNA-Bank aus *Phaeodactylum tricornutum* wurde die Erststrangsynthese unter Verwendung von Reverser Transkriptase aus Maus-Leukämie-Virus (Roche, Mannheim, Deutschland) und Oligo-d(T)-Primern, die Zweitstrangsynthese durch Inkubation mit DNA-Polymerase I, Klenow-Enzym und RNase H-Spaltung bei 12°C (2 Std.), 16°C (1 Std.) und 22°C (1 Std.) erzielt. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65°C (10 min) gestoppt und anschließend auf Eis überführt. Doppelsträngige DNA-Moleküle wurde mit T4-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) bei 37°C (30 min) mit glatten Enden versehen. Die Nukleotide wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Sephadex-G50-Zentrifugiersäulen entfernt. EcoRI/XhoI-Adapter (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) wurden mittels T4-DNA-Ligase (Roche, 12°C, über Nacht) an die cDNA-Enden ligiert, mit XhoI nachgeschnitten und durch Inkubation mit Polynukleotidkinase (Roche, 37°C, 30 min) phosphoryliert. Dieses Gemisch wurde der Trennung auf einem Low-Melting-Agarose-Gel unterworfen. DNA-Moleküle über 300 Basenpaaren wurden aus dem Gel eluiert, Phenol-extrahiert, auf Elutip-D-Säulen (Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) konzentriert und an Vektorarme

ligiert und in lambda-ZAP-Express-Phagen unter Verwendung des Gigapack Gold-Kits (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verpackt, wobei Material des Herstellers verwendet und seine Anweisungen befolgt wurden.

5

Beispiel 5: DNA-Sequenzierung und Computeranalyse

cDNA-Banken, wie im Beispiel 4 beschrieben, wurden zur DNA-Sequenzierung nach Standardverfahren, insbesondere durch das
10 Kettenterminationsverfahren unter Verwendung des ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Deutschland), verwendet. Die Sequenzierung zufälliger, vereinzelter Klone wurde anschließend an die präparative Plasmidgewinnung aus cDNA-Banken über in vivo-Massen-
15 excision und Retransformation von DH10B auf Agarplatten durchgeführt (Einzelheiten zu Material und Protokoll von Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Plasmid-DNA wurde aus über Nacht gezüchteten E. coli-Kulturen, die in Luria-Brühe mit Ampicillin (siehe Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory
20 Press: ISBN 0-87969-309-6)) gezüchtet worden waren, an einem Qiagen-DNA-Präparations-Roboter (Qiagen, Hilden) nach den Protokollen des Herstellers präpariert. Sequenzierprimer mit den folgenden Nukleotidsequenzen wurden verwendet:

25 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
5'-CTAAAGGGAACAAAAGCTG-3'
5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'

Die Sequenzen wurden unter Verwendung des Standard-Softwarepa-
30 kets EST-MAX, das kommerziell von Bio-Max (München, Deutschland) geliefert wird, prozessiert und annotiert. Durch Nutzung von Vergleichsalgorithmen und unter Verwendung der in SEQ ID NO: 8 dargestellten Suchsequenz wurde mithilfe des BLAST-Programms nach homologen Genen gesucht (Altschul et al. (1997) "Gapped BLAST and
35 PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.). Zwei Sequenzen aus Phaeodactylum tricornutum mit Homologien zur Suchsequenz aus Physcomitrella patens wurden eingehender charakterisiert.

40

45

78

Beispiel 5a: Isolation von Desaturasen aus *Phaeodactylum tri-cornutum* über Polymerase Kettenreaktion mithilfe degenerierter Oligonukleotide:

- 5 Mithilfe von publizierten Desaturasen können Motive identifiziert werden, die für Δ -5 und Δ -6 Desaturasen typisch sind. Im folgenden sind Oligonukleotidsequenzen mit möglichen Variationen dargestellt. Unter der Oligonukleotidsequenz ist im Ein-Buchstaben-code die Aminosäure dargestellt, von der die Basenkombination
- 10 abgeleitet werden kann. Z.B. bedeutet A/G, daß an dieser Position bei der Synthese des Bausteins statistisch gleichverteilt entweder ein A oder ein G in das Oligonukleotid eingebaut wird, da das von der korrespondierenden Aminosäure abgeleitete Basen-triplett entweder ein AAA oder ein AAG sein kann. Die DNA Sequenz
- 15 kann auch ein Inosin (i) enthalten, wenn die Bestimmung einer Base an dieser Position aufgrund des genetischen Codes drei oder vier unterschiedliche Basen erlaubt. Folgende Sequenzen und Primer können verwendet werden:

20 5'-Vorwärts-Primer:

F1a:	TGG	TGG	AA	A/G	TGG	AAi	CA	T/C	AA
F1b:	TGG	TGG	AA	A/G	TGG	ACi	CA	T/C	AA
F1a:	W	W	K		W	N/T	H		K/N
F1b:	W	W	K		W	K	H		K/N

25

F2a:	Gi	TGG	AA	A/G	GAi	A/C	Ai	CA	T/C	AA
F2b:	Gi	TGG	AA	A/G	TTG	A/C	Ai	CA	T/C	AA
F2a:	G/W	W	K		E/D	K/Q/N	H			K/N
F2b:	G/W	W	K		W	K/Q/N	H			K/N

30 F3a: T A/T i TTG AAi A/C A A/G C/A G/A i CA
 F3b: T A/T i TTG AAi A/C A A/G CAi CA
 F3a: W W K/N H/N R/Q H
 F3b: Y W K/N H/N R/Q H

F4a: GTi TGG A A/T G/A GA A/G CA A/G CA

35 F4b: GTi TGG A A/T G/A A/T A T/C CA A/G CA

F4a: V W K/M E Q H

F4b: V W K/M N/Y Q H

F5a1: CA T/C TA T/C TGG AA A/G AA T/C CA G C

F5a1: CA T/C TA T/C TGG AA A/G AA T/C CA A C

40 F5a1: H Y W K N Q H/Q

F6a: TTG TTG AAi A/C A A/G AA i CA T/C AA

F6a: W W K/N H/N K/N H K/N

79

3'- Reverse Primer

	R1b:	GG	A/G	AA	iAG	G/A	TG	G/A	TG	T/C	TC			
	R1b:	GG	A/G	AA	iAA	G/A	TG	G/A	TG	T/C	TC			
	R1a:	P		F	L		H		H		E			
5	R1b:	P		F	F		H		H		E			
	R2a1:	AA		iAG	A/G	TG	A/G	TG	iA	C/T	iA/G	T/C	TG	
	R2a2:	AA	T/C	AA	A/G	TG	A/G	TG	iA	C/T	iA/G	T/C	TG	
	R2a1:	F		L		H		H	V/I		V/A		Q	
	R3a1:	AT	iTG		iGG	A/G	AA	iAA	A/G	TG	A/G	TG		
10	R3a2:	AT	A/G	TT	iGG	A/G	AA	iAA	A/G	TG	A/G	TG		
	R3a3:	AT	iTG		iGG	A/G	AA	iAG	A/G	TG	A/G	TG		
	R3a4:	AT	A/G	TT	iGG	A/G	AA	iAG	A/G	TG	A/G	TG		
	R3a1:	I/M	H/Q		P	F		F		H		H		
	R3a2:	I/M	N		P	F		L		H		H		
15	R4a1:		CT		iGG	A/G	AA	iA	A/G	A/G	TG	A/G	TG	
	R4a2:		GA		iGG	A/G	AA	iA	A/G	A/G	TG	A/G	TG	
	R4a3:		GT		iGG	A/G	AA	iA	A/G	A/G	TG	A/G	TG	
	R4a1:	=	T/R/S		P	F		F/L		H		H		
	R5a1:	AA	iAA		A/G	TG	A/G	TG	T/C	TC	T/A/G	AT	T/C	TG
20	R5a2:	AA	iAG		A/G	TG	A/G	TG	T/C	TC	T/A/G	AT	T/C	TG
	R5a1:	F	F			H		H		E		I		Q
	R5a2:	F	L			H		H		E		I		Q
	R6a1:	T		iGG	iA	A/G		iAA	A/G	TG	A/G	TG	iAC	
	R6a1:	T		iGG	iA	A/G		iAG	A/G	TG	A/G	TG	iAC	
25	R6a1:	T/N		P	L			F/L		H		H		V

Aufgrund verschiedener Variationsmöglichkeiten sind viele abgeleitete Oligonukleotide möglich, jedoch überraschenderweise gefunden wurde, dass dargestellte Oligonukleotide besonders zur Isolation von Desaturasen geeignet sein können.

Die Primer können in allen Kombinationen für Polymerase Kettenreaktionen eingesetzt werden. Mithilfe einzelner Kombinationen konnten Desaturase-Fragmente isoliert, wenn nachfolgende Bedingungen berücksichtigt wurden: Für PCR Reaktionen wurden jeweils 10 nMol Primer und 10 ng einer durch in vivo Excision gewonnenen Plasmidbank eingesetzt. Die Plasmidbank konnte nach Protokollen des Herstellers (Stratagene) aus der Phagenbank isoliert werden. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (Biometra) mit der Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene) und dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt: 3 min bei 96°C, gefolgt von 35 Zyklen mit 30 s bei 96°C, 30 s bei 55°C und 1 min bei 72°C. Dabei wurde die Anlagerungstemperatur nach dem ersten Schritt von 55°C schrittweise um je 3°C erniedrigt und nach dem fünften Zyklus eine Anlagerungstemperatur von 40°C beibehalten. Letztlich wurde

80

ein Zyklus mit 10 min bei 72°C durchgeführt und der Ansatz durch Kühlen auf 4°C beendet.

Die Primerkombination F6a und R4a2 sind im Text unterstrichen
5 gekennzeichnet und konnten erfolgreich zur Isolierung eines
Desaturasefragmentes genutzt werden. Das resultierende Fragment
konnte durch Sequenzierung verifiziert werden und zeigte Homo-
logien zu einer Desaturase mit der Genbank Accession Nr. T36617
aus *Streptomyces coelicolor*. Die Homologie wurde mithilfe des
10 BLASTP Programmes erhalten. Der Vergleich ist in Figur 4 dar-
gestellt. Es ergaben sich Identitäten von 34 % und eine Homo-
logie von 43 % zu Sequenz T36617. Das DNA-Fragment wurde gemäß
Beispiel 7 in einem Hybridisierungsexperiment zur Isolierung
eines Volllängengens nach Standardbedingungen erfindungsgemäß
15 eingesetzt.

Die Codierregion einer so isolierten DNA-Sequenz wurde durch
Übersetzung des genetischen Codes in eine Polypeptidsequenz
erhalten. In SEQ ID NO: 3 ist eine 1434 Basenpaare lange
20 Sequenz dargestellt, die durch beschriebenes Verfahren isoliert
werden konnte. Die Sequenz besitzt ein Startcodon in Position 1
bis 3 und ein Stopcodon in Position 1432-1434 und konnte in ein
477 Aminosäuren langes Polypeptid übersetzt werden. Durch Ver-
gleich mit einer in WO 98 46763 beschriebenen Gensequenz wurde
25 gefunden, dass ein nicht identisches aber homologes Fragment
aus *Phaeodactylum tricornutum* codierend für 87 Aminosäuren
vorbeschrieben wurde. Jedoch offenbart WO 98/46763 weder eine
vollständige, funktionell aktive Desaturase noch Positions-
oder Substratspezifität. Dies wird auch dadurch deutlich, dass
30 sowohl Homologien zur Δ -5, als auch zur Δ -6-Desaturase aus
Mortierella alpina berichtet werden, ohne eine genaue Funktion
festzulegen. Die erfindungsgemäße Sequenz hingegen codiert für
eine funktionell aktive Δ -6-Acyl Lipid Desaturase.

35 Beispiel 6: Identifizierung von DNA Sequenzen codierend für
Desaturasen aus *Phaeodactylum tricornutum*

Die Volllängensequenz der Δ -6-Acyl Lipid Desaturase Pp_des6
AJ222980 (NCBI Genbank Accession Nr.) aus dem Moos Physco-
40 mitrella patens (siehe auch Tabelle 1) sowie die Δ -12-acyl Lipid
Desaturase Sequenz (Tabelle 1 siehe Ma_des12) aus *Mortierella*
alpina AF110509 (AF110509 NCBI Genbank Accession Nr.) wurden
für Sequenzvergleiche mithilfe des TBLASTN Suchalgorithmus
eingesetzt.

45

81

Die EST-Sequenzen PT0010070010R, PT001072031R sowie PT001078032R wurden zunächst aufgrund schwacher Homologien mit den Suchsequenzen aus *Physcomitrella* und *Mortierella* unter weiteren Kandidatengenen als Zielgen in Betracht gezogen. In Figur 1 und 5 in Figur 2 sowie Figur 2a ist das Ergebnis der zwei gefundenen est-Sequenzen dargestellt. Die gefundenen Sequenzen sind Teil der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren aus SEQ ID NO: 1 (Genname: Pt_des5, eigene Datenbank Nr. der Erfinder PT001078032R), SEQ ID NO: 5. (Genname: Pt_des12, eigene Datenbank NR. der 10 Erfinder PT0010070010R) und SEQ ID NO: 11 (Genname: Pt_des12.2, eigene Datenbank des Erfinders PT001072031R). Buchstaben zeigen identische Aminosäuren an, während das Pluszeichen eine chemisch ähnliche Aminosäure bedeutet. Die Identitäten bzw. Homologien aller erfindungsgemäß gefundener Sequenzen gehen aus Tabelle 2 15 zusammenfassend hervor.

Desaturasen können Cytochrom b5 Domänen aufweisen, die auch in anderen nicht Desaturasen codierenden Genen vorkommen. Cytochrom b5 Domänen zeigen mithin hohe Homologien an, obwohl es sich um 20 verschiedene Genfunktionen handelt. Desaturasen können schwach konservierter Bereiche lediglich als putative Kandidatengene identifiziert werden und müssen auf die Enzymaktivität und Positionsspezifität der enzymatischen Funktion hin geprüft werden. Beispielsweise zeigen auch verschiedene Hydroxylasen, 25 Acetylasen und Epoxxygenasen ähnlich wie Desaturasen Histidin-Box Motive, so dass eine konkrete Funktion experimentell nachgewiesen werden muß und zusätzlich die Verifizierung der Doppelbindung erst eine sichere Enzymaktivität und Positionsspezifität einer Desaturase ermöglicht. Überraschenderweise wurde gefunden, 30 dass erfindungsgemäße Δ -6- und Δ -5- Desaturase besonders geeignete Substratspezifitäten aufweisen und besonders geeignet sind, um in Kombination mit einer Δ -6-Elongase aus *Physcomitrella* zur Produktion von polyungesättigten Fettsäuren wie Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure genutzt werden können. 35

Die Sequenzierung des vollständigen cDNA Fragmentes aus Klon PT001078032R ergab eine 1652 Basenpaare lange Sequenz. Die Sequenz codiert für ein Polypeptid von 469 Aminosäuren dargestellt in SEQ ID NO: 2. Diese wurde erhalten durch Übersetzung des genetischen Codes aus SEQ ID NO: 1 mit einem Startcodon in Basenpaarposition 115-117 und mit einem Stoppcodon in Basenpaarposition 1522-1524. Der Klon beinhaltet ein vollständiges Desaturase-Polypeptid, wie aus dem Sequenzvergleich in Figur 3 zu ersehen ist. Striche bedeuten identische Aminosäuren während Doppelpunkte und Einzelpunkte chemisch austauschbare, d.h. chemisch äquivalente Aminosäuren darstellen. 45 Der Vergleich wurde mit der BLOSUM62 Austauschmatrix für Amino-

82

säuren nach Henikoff & Henikoff durchgeführt: ((1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919). Verwendete Parameter: Gap Weight: 8; Average Match: 2.912, Length Weight: 2, Average Mismatch: -2.003.

5

In Figur 6 und Figur 7 ist der Vergleich der MA_des12 Peptidsequenz mit den gefundenen Sequenzen dargestellt.

Die Sequenzierung des vollständigen cDNA Fragmentes aus Klon
10 PT0010070010R ergab eine in SEQ ID NO: 5 dargestellte 1651 Basenpaare lange Sequenz mit einem Startcodon in Position 67-69 und einem Stopcodon in Position 1552-1554. Die erfindungsgemäße Polypeptidsequenz ist in SEQ ID NO: 6 dargestellt.

15 Die Sequenzierung des vollständigen identifizierten cDNA Fragmentes aus Klon PT0010072031R ergab eine in SEQ ID NO: 11 dargestellte 1526 Basenpaare lange Sequenz mit einem Startcodon in Position 92-94 und einem Stopcodon in Position 1400-1402. Die erfindungsgemäße Polypeptidsequenz ist in SEQ ID NO: 12
20 dargestellt.

In Tabelle 2 sind die Identitäten und Homologien erfindungsgemäßer Desaturasen untereinander und mit der Desaturase aus *Physcomitrella patens* und *Mortierella alpina* dargestellt. Die
25 Angaben wurden mithilfe des Programms Bestfit unter gegebenen Parametern wie unten definiert als Teilprogramm folgender Software erhalten: Wisconsin Package Version 10.0 (Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc., USA). Henikoff, S. and Henikoff, J.G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein
30 blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919.

Weiterhin ist in Figur 5 der Vergleich der Δ -6-acyl Lipid Desaturase aus *Physcomitrella patens* mit der Polypeptidsequenz des Klons Pt_des6 dargestellt.

35

Tabelle 2:

40	Homologie /	Suchsequenz	Suchsequenz
	Identität in %	Pp_des6	Ma_des12
	Pt_des5	34.92/26.37	n.d.
	Pt_des6	50.69/41.06	n.d.
	Pt_des12	n.d.	48.58/38.92
	Pt_des12.2	n.d.	48.37/41.60

45 n.d. = nicht durchgeführt

83

Mithilfe des Algorithmus TBLASTN 2.0.10: Altschul et al 1997, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 wurden über einen lokalen Datenbankvergleich Sequenzen mit höchster Sequenz-
 5 homologie bzw. Identität identifiziert. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 2A dargestellt.

Tabelle 2A: Homologe mit den höchsten Sequenzhomologien bzw Identitäten zu erfindungsgemäßen Polypeptidsequenzen
 10 aus SEQ ID NO. 2, 4, 6 oder 12

Homologie / Identität (%)	Suchsequenz PT001070010R	Suchsequenz PT001072031R	Suchsequenz PT001078032R	Suchsequenz Pt_des6
15 L26296: Fad2 A. thaliana	50 % / 37 %	n.d.	n.d.	n.d.
U86072 Petro- selinum crispum Fad2	n.d.	51/40	n.d.	n.d.
20 AL358652 L. major putative desaturase	n.d.	n.d.	45/30	n.d.
25 AB020032 M. alpina delta 6 desaturase	n.d.	n.d.	n.d.	53/38

Beispiel 7: Identifikation von Genen mittels Hybridisierung

30 Gensequenzen lassen sich zur Identifikation homologer oder heterologer Gene aus cDNA- oder genomischen Banken verwenden.

Homologe Gene (d.h. Voll-Längen-cDNA-Klone, die homolog sind, oder Homologen) lassen sich über Nukleinsäurehybridisierung unter Verwendung von beispielsweise cDNA-Banken isolieren: Ins-
 35 besondere zur Isolierung von funktionell aktiven Voll-Längengenen der in SEQ ID NO: 3 gezeigten kann die Methode genutzt werden. Je nach der Häufigkeit des Gens von Interesse werden 100000 bis zu 1000000 rekombinante Bakteriophagen plattiert und auf eine Nylonmembran überführt. Nach der Denaturierung mit Alkali wurde
 40 die DNA auf der Membran z.B. durch UV-Vernetzung immobilisiert. Die Hybridisierung erfolgt bei hoch-stringenten Bedingungen. In wässriger Lösung werden die Hybridisierung und die Waschschrte bei einer Ionenstärke von 1 M NaCl und einer Temperatur von 68°C durchgeführt. Hybridisierungssonden wurden z.B. durch Markierung
 45 mittels radioaktiver (³²P-) Nicktranskription (High Prime, Roche,

Mannheim, Deutschland) hergestellt. Die Signale werden mittels Autoradiographie nachgewiesen.

Partiell homologe oder heterologe Gene, die verwandt, aber nicht
5 identisch sind, lassen sich analog zum oben beschriebenen Verfahren unter Verwendung niedrig-stringenter Hybridisierungs- und Waschbedingungen identifizieren. Für die wässrige Hybridisierung wurde die Ionenstärke gewöhnlich bei 1 M NaCl gehalten, wobei die Temperatur nach und nach von 68 auf 42°C gesenkt wurde.

10

Die Isolierung von Gensequenzen, die nur zu einer einzelnen Domäne von beispielsweise 10 bis 20 Aminosäuren Homologien aufweisen, lässt sich unter Verwendung synthetischer, radioaktiv markierter Oligonukleotidsonden durchführen. Radioaktiv markierte
15 Oligonukleotide werden mittels Phosphorylierung des 5'-Endes zweier komplementärer Oligonukleotide mit T4-Polynukleotidkinase hergestellt. Die komplementären Oligonukleotide werden aneinander hybridisiert und ligiert, so dass Konkatemere entstehen. Die doppelsträngigen Konkatemere werden beispielsweise durch Nick-
20 transkription radioaktiv markiert. Die Hybridisierung erfolgt gewöhnlich bei niedrig-stringenten Bedingungen unter Verwendung hoher Oligonukleotidkonzentrationen.

Oligonukleotid-Hybridisierungslösung:

25

6 x SSC

0,01 M Natriumphosphat

1 mM EDTA (pH 8)

0,5 % SDS

30 100 mikrog/ml denaturierte Lachssperma-DNA

0,1 % fettarme Trockenmilch

Während der Hybridisierung wird die Temperatur schrittweise auf 5 bis 10°C unter die berechnete Oligonukleotid-T_m oder bis auf Raum-
35 temperatur (bedeutet RT = ~ 23°C in allen Experimenten, wenn nicht anders angegeben) gesenkt, gefolgt von Waschschritten und Autoradiographie. Das Waschen wird mit extrem niedriger Stringenz durchgeführt, zum Beispiel 3 Waschschrritte unter Verwendung von 4 X SSC. Weitere Einzelheiten sind wie von Sambrook, J., et al.
40 (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, oder Ausubel, F.M., et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, beschrieben.

85

Beispiel 8: Identifikation von Zielgenen durch Sichtung von Expressionsbanken mit Antikörpern

Es wurden cDNA-Sequenzen zur Herstellung von rekombinantem
5 Protein zum Beispiel in *E. coli* verwendet (z.B. Qiagen QIAexpress
pQE-System). Die rekombinanten Proteine wurden dann gewöhnlich
über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Qiagen) affinitäts-
gereinigt. Die rekombinanten Proteine wurden dann zur Herstellung
spezifischer Antikörper beispielsweise unter Verwendung von
10 Standardtechniken zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.
Anschließend wurden die Antikörper dann unter Verwendung einer
Ni-NTA-Säule, die mit rekombinantem Antigen vorgesättigt wird,
affinitätsgereinigt, wie von Gu et al., (1994) *BioTechniques*
17:257-262 beschrieben. Der Antikörper kann dann zur Durch-
15 musterung von Expressions-cDNA-Banken mittels immunologischem
Sichtung verwendet werden (Sambrook, J., et al. (1989),
"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor
Laboratory Press, oder Ausubel, F.M., et al. (1994) "Current
Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons).

20

Beispiel 9: Transformation von *Agrobacterium*

Die *Agrobacterium*-vermittelte Pflanzentransformation kann zum
Beispiel unter Verwendung des GV3101- (pMP90-) (Koncz und Schell,
25 *Mol. Gen. Genet.* 204 (1986) 383-396) oder LBA4404- (Clontech)
oder C58C1 pGV2260 (Deblaere et al 1984, *Nucl. Acids Res.* 13,
4777-4788) *Agrobacterium tumefaciens*-Stamms durchgeführt werden.
Die Transformation kann durch Standard-Transformationstechniken
durchgeführt werden (ebenfalls Deblaere et al. 1984).

30

Beispiel 10: Pflanzentransformation

Die *Agrobacterium*-vermittelte Pflanzentransformation kann unter
Verwendung von Standard-Transformations- und Regenerations-
35 techniken durchgeführt werden (Gelvin, Stanton B., Schilperoort,
Robert A., *Plant Molecular Biology Manual*, 2. Aufl., Dordrecht:
Kluwer Academic Publ., 1995, in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur:
BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R., Thompson, John E.,
Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton:
40 CRC Press, 1993, 360 S., ISBN 0-8493-5164-2).

Beispielsweise kann Raps mittels Kotyledonen- oder Hypokotyl-
transformation transformiert werden (Moloney et al., *Plant*
Cell 8 (1989) 238-242; De Block et al., *Plant Physiol.* 91 (1989)
45 694-701). Die Verwendung von Antibiotika für die *Agrobacterium*-
und Pflanzenselektion hängt von dem für die Transformation
verwendeten binären Vektor und *Agrobacterium*-Stamm ab. Die

86

Rapsselektion wird gewöhnlich unter Verwendung von Kanamycin als selektierbarem Pflanzenmarker durchgeführt.

Der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer in Lein (*Linum usitatissimum*) lässt sich unter Verwendung von beispielsweise einer von Mlynarova et al. (1994) Plant Cell Report 13:282-285 beschriebenen Technik durchführen.

Die Transformation von Soja kann unter Verwendung von beispielsweise einer in EP-A-0 0424 047 (Pioneer Hi-Bred International) oder in EP-A-0 0397 687, US 5,376,543, US 5,169,770 (University Toledo) beschriebenen Technik durchgeführt werden.

Die Pflanzentransformation unter Verwendung von Teilchenbeschuss, Polyethylenglycol-vermittelter DNA-Aufnahme oder über die Siliziumcarbonatfaser-Technik ist beispielsweise beschrieben von Freeling und Walbot "The maize handbook" (1993) ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag New York).

20 Beispiel 11: Plasmide für die Pflanzentransformation

Zur Pflanzentransformation können binäre Vektoren, wie pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221-230) oder pGPTV (Becker et al 1992, Plant Mol. Biol. 20:1195-1197) oder Derivate davon verwendet werden. Die Konstruktion der binären Vektoren kann durch Ligation der cDNA in Sense- oder Antisense-Orientierung in T-DNA erfolgen. 5' der cDNA aktiviert ein Pflanzenpromotor die Transkription der cDNA. Eine Polyadenylierungssequenz befindet sich 3' von der cDNA. Die binären Vektoren können unterschiedliche Markergene tragen. Insbesondere kann das nptII-Markergen codierend für Kanamycin-Resistenz vermittelt durch Neomycinphosphotransferase gegen die herbizidresistente Form eines Acetolactat Synthasegens (Abkürzung: AHAS oder ALS) ausgetauscht werden. Das ALS-Gen ist beschrieben in Ott et al., J. Mol. Biol. 1996, 263:359-360. Der v-ATPase-c1-Promotor kann in das Plasmid pBin19 oder pGPTV kloniert werden und durch Klonierung vor das ALS Codierregion für die Markergenexpression genutzt werden. Der genannte Promotor entspricht einem 1153 Basenpaarfragment aus beta-Vulgaris (Plant Mol Biol, 1999, 39:463-475). Dabei können sowohl Sulphonylharnstoffe als auch Imidazolinone wie Imazethapyr oder Sulphonylharnstoffe als Antimetaboliten zur Selektion verwendet werden.

87

Die gewebespezifische Expression lässt sich unter Verwendung eines gewebespezifischen Promotors erzielen. Beispielsweise kann die samenspezifische Expression erreicht werden, indem der DC3- oder der LeB4- oder der USP-Promotor oder der Phaseolin-Promotor 5' der cDNA einkloniert wird. Auch jedes andere samenspezifische Promotorelement wie z.B. der Napin- oder Arcelin Promotor Goossens et al. 1999, Plant Phys. 120(4):1095-1103 und Gerhardt et al. 2000, Biochimica et Biophysica Acta 1490(1-2):87-98) kann verwendet werden. Zur konstitutiven Expression in der ganzen Pflanze lässt sich der CaMV-35S-Promotor oder ein v-ATPase C1 Promotor verwenden.

Insbesondere lassen sich Gene codierend für Desaturasen und Elongasen durch Konstruktion mehrerer Expressionskassetten hintereinander in einen binären Vektor klonieren, um den Stoffwechselweg in Pflanzen nachzubilden.

Innerhalb einer Expressionskassette kann das zu exprimierende Protein unter Verwendung eines Signalpeptids, beispielsweise für Plastiden, Mitochondrien oder das Endoplasmatische Retikulum, in ein zelluläres Kompartiment dirigiert werden (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423). Das Signalpeptid wird 5' im Leseraster mit der cDNA einkloniert, um die subzelluläre Lokalisierung des Fusionsprotein zu erreichen.

Beispiele für Multiexpressionskassetten sind im folgenden gegeben.

I.) Promotor-Terminator-Kassetten

Expressionskassetten bestehen aus wenigstens zwei funktionellen Einheiten wie einem Promotor und einem Terminator. Zwischen Promotor und Terminator können weitere gewünschte Gensequenzen wie Targetting-Sequenzen, Codierregionen von Genen oder Teilen davon etc. eingefügt werden. Zum Aufbau von Expressionskassetten werden Promotoren und Terminatoren (USP Promotor: Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459-67); OCS Terminator: Gielen et al. EMBO J. 3 (1984) 835ff.) mithilfe der Polymerasekettenreaktion isoliert und mit flankierenden Sequenzen nach Wahl auf Basis von synthetischen Oligonukleotiden maßgeschneidert.

88

Folgende Oligonukleotide können beispielsweise verwendet werden:

- USP1 vorne: CCGGAATTTCGGCGCGCCGAGCTCCTCGAGCAAATTTACACATTGCCA
 USP2 vorne: CCGGAATTTCGGCGCGCCGAGCTCCTCGAGCAAATTTACACATTGCCA
 USP3 vorne: CCGGAATTTCGGCGCGCCGAGCTCCTCGAGCAAATTTACACATTGCCA
 5 USP1 hinten: AAAACTGCAGGCGGCCGCCACCGCGGTGGGCTGGCTATGAAGAAATT
 USP2 hinten: CGCGGATCCGCTGGCTATGAAGAAATT
 USP3 hinten: TCCCCCGGGATCGATGCCGGCAGATCTGCTGGCTATGAAGAAATT
 OCS1 vorne: AAAACTGCAGTCTAGAAGGCCTCCTGCTTTAATGAGATAT
 OCS2 vorne: CGCGGATCCGATATCGGGCCCGCTAGCGTTAACCCCTGCTTTAATGAGATAT
 10 OCS3 vorne: TCCCCCGGGCCATGGCCTGCTTTAATGAGATAT
 OCS1 hinten: CCAAGCTTGGCGCGCCGAGCTCGAATTCGTCGACGGACAATCAGTAAATTGA
 OCS2 hinten: CCAAGCTTGGCGCGCCGAGCTCGAATTCGTCGACGGACAATCAGTAAATTGA
 OCS3 hinten: CCAAGCTTGGCGCGCCGAGCTCGTCGACGGACAATCAGTAAATTGA

- 15 Die Methoden sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt und sind allgemein literaturbekannt.

- In einem ersten Schritt werden ein Promotor und ein Terminator über PCR amplifiziert. Dann wird der Terminator in ein Empfänger-
- 20 plasmid kloniert und in einem zweiten Schritt der Promotor vor den Terminator inseriert. Mithin erhält man eine Expressionskassette auf einem Trägerplasmid. Auf Basis des Plamides pUC19 werden die Plasmide pUT1, pUT2 und pUT3 erstellt.
- 25 Die Konstrukte sind erfindungsgemäß in SEQ ID NO: 13, 14 und 15 definiert. Sie enthalten auf Basis von pUC19 den USP-Promotor und den OCS Terminator. Auf Basis dieser Plasmide wird das Konstrukt pUT12 erstellt, indem pUT1 mittels SalI/ScaI geschnitten wird und pUT2 mittels XhoI/ScaI geschnitten wird. Die die Expressions-
- 30 kassetten enthaltenden Fragmente werden ligiert und in E. coli XLI blue MRF transformiert. Es wird nach Vereinzellung ampicillin-resistenter Kolonien DNA präpariert und per Restriktionsanalyse solche Klone identifiziert, die zwei Expressionskassetten enthalten. Die XhoI/SalI Ligation kompatibler Enden hat dabei die
- 35 beiden Schnittstellen XhoI und SalI zwischen den Expressionskassetten eliminiert. Es resultiert das Plasmid pUT12, das in SEQ ID NO: 16 definiert ist. Anschließend wird pUT12 wiederum mittels Sal/ScaI geschnitten und pUT3 mittels XhoI/ScaI geschnitten. Die die Expressionskassetten enthaltenden Fragmente
- 40 werden ligiert und in E. coli XLI blue MRF transformiert. Es wird nach Vereinzellung ampicillinresistenter Kolonien DNA präpariert und per Restriktionsanalyse solche Klone identifiziert, die drei Expressionskassetten enthalten. Auf diese Weise wird ein Set von Multiexpressionskassetten geschaffen, dass für die Insertion ge-
- 45 wünschter DNA genutzt werden kann und in Tabelle 3 beschrieben wird und zudem noch weitere Expressionskassetten aufnehmen kann.

89

Diese enthalten folgende Elemente:

Tabelle 3

5	pUC19-Derivat	Schnittstellen vor dem USP Promotor	Multiple Klonierungs-Schnittstellen	Schnittstellen hinter dem OCS-Terminator
	pUT1	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI	SalI/EcoRI/ SacI/AscI/ HindIII
	pUT2	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI	SalI/EcoRI/ SacI/AscI/ HindIII
10	pUT3	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/ AscI/HindIII
	pUT12 Doppel-expressionskassette	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI Und BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI	SalI/EcoRI/ SacI/AscI/ HindIII
15	pUT123 Tripel-expressionskassette	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	1.BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI und 2.BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/ HpaI und 3.BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/AscI/HindIII

20

Weiterhin lassen sich wie beschrieben und wie in Tabelle 4 näher spezifiziert weitere Multiexpressionskassetten mithilfe des

- i) USP-Promotors oder mithilfe des
 - 25 ii) ca. 700 Basenpaare 3'-Fragmentes des LeB4-Promotors oder mithilfe des
 - iii) DC3-Promotors erzeugen und für samenspezifische Genexpression einsetzen.
- 30 Der DC3-Promotor ist beschrieben bei Thomas, Plant Cell 1996, 263:359-368 und besteht lediglich aus der Region -117 bis +27 weshalb er mithin einer der kleinsten bekannten samenspezifischen Promotoren darstellt. Die Expressionskassetten können mehrfach den selben Promotor enthalten oder aber über drei verschiedene
- 35 Promotoren aufgebaut werden.

40

45

Tabelle 4: Multiple Expressionskassetten

	Plasmidname des pUC19-Derivates	Schnittstellen vor dem jeweiligen Promotor	Multiple Klonierungs-Schnittstellen	Schnittstellen hinter dem OCS-Terminator
5	pUT1 (pUC19 mit USP-OCS1)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(1) BstXI/NotI/PstI/ XbaI/StuI	SalI/EcoRI/SacI/AscI/HindIII
	pDCT (pUC19 mit DC3-OCS)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(2) BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/HpaI	SalI/EcoRI/SacI/AscI/HindIII
10	pLeBT (pUC19-mit LeB4(700)-OCS)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(3) BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/AscI/HindIII
15	pUD12 (pUC 19 mit mit USP-OCS1 und mit DC3-OCS)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(1) BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI und (2) BamHI/EcoRV/ ApaI/NheI/HpaI	SalI/EcoRI/SacI/AscI/HindIII
20	pUDL123 Triple expression cassette (pUC19 mit USP/ DC3 und LeB4-700)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(1) BstXI/NotI/ PstI/XbaI/StuI und (2) BamHI/ (EcoRV*)/ApaI/ NheI/HpaI und (3) BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/AscI/HindIII

* EcoRV Schnittstelle schneidet im 700 Basenpaarfragment des LeB4 Promotors (LeB4-700)

25

Analog lassen sich weitere Promotoren für Multigenkonstrukte erzeugen insbesondere unter Verwendung des

- a) 2,7 kB Fragmentes des LeB4-Promotors oder mithilfe des
 30 b) Phaseolin-Promotors oder mithilfe des
 c) konstitutiven v-ATPase c1-Promotors.

Es kann insbesondere wünschenswert sein, weitere besonders geeignete Promotoren zum Aufbau samenspezifischer Multiexpressions-
 35 kassetten wie z.B. den Napin-Promotor oder den Arcelin-5 Promotor zu verwenden.

- ii) Erstellung von Expressionskonstrukten in pUC19- oder pGPTV Derivaten, die Promotor und Terminator erhalten und in
 40 Kombination mit gewünschten Gensequenzen zur PUFA Gen-expression in pflanzlichen Expressionskassetten enthalten.

Multiexpressionskassetten können mittels AscI direkt von pUC19-Derivaten aus Tabelle 3 in den Vektor pGPTV+AscI (siehe
 45 iii.)) über die AscI Schnittstelle inseriert werden und stehen zur Inserierung von Zielgenen zur Verfügung. Die entsprechenden Genkonstrukte (pBUT1 ist in SEQUENZ ID NO: 20, pBUT2 ist in

91

SEQUENZ ID NO: 21, pBUT 3 ist in SEQUENZ ID NO: 22, pBUT12 ist in SEQUENZ ID NO: 22 und pBUT123 ist in SEQUENZ ID NO: 24 dargestellt) stehen erfindungsgemäß als Kit zur Verfügung.

Alternativ können Gensequenzen in die pUC19 basierten

- 5 Expressionskassetten inseriert werden und als AscI Fragment in pGPTV+AscI eingesetzt werden.

In pUT12 wird zunächst über BstXI und XbaI die D-6-Elongase Pp_PSE1 in die erste Kassette inseriert. Dann wird die

- 10 D-6-Desaturase aus Moos (Pp_des6) über BamHI/NaeI in die zweite Kassette inseriert. Es entsteht das Konstrukt pUT-ED. Das AscI Fragment aus dem Plasmid pUT-ED wird in den mit AscI geschnittenen Vektor pGPTV+AscI inseriert und die Orientierung des inserierten Fragmentes mittels Restriktion oder Sequenzierung
- 15 ermittelt. Es entsteht das Plasmid pB-DHGLA, dessen vollständige Sequenz in SEQUENZ ID NO. 25 dargestellt ist. Die Codierregion der Physcomitrella delta 6 Elongase ist in SEQUENZ ID NO. 26 dargestellt, die der delta 6 Desaturase aus Physcomitrella in SEQUENZ ID NO: 27.

20

In pUT123 wird zunächst über BstXI und XbaI die Δ -6-Elongase Pp_PSE1 in die erste Kassette inseriert. Dann wird die Δ -6-Desaturase aus Moos (Pp_des6) über BamHI/NaeI in die zweite Kassette inseriert und schließlich die Δ -5-Desaturase

25 aus Phaeodactylum (Pt_des5) über BglIII in die dritte Kassette inseriert. Das Dreifachkonstrukt erhält den Namen pARA1. Unter Berücksichtigung sequenzspezifischer Restriktionsschnittstellen können weitere Expressionskassetten gemäß Tabelle 5 mit der Bezeichnung pARA2, pARA3 und pARA4 erstellt werden.

30

Das AscI Fragment aus dem Plasmid pARA1 wird in den mit AscI geschnittenen Vektor pGPTV+AscI inseriert und die Orientierung des inserierten Fragmentes mittels Restriktion oder Sequenzierung ermittelt. Die vollständige Sequenz des resultierenden Plasmides

35 pBARA1 ist in SEQUENZ ID NO. 28 dargestellt. Die Codierregion der Physcomitrella delta 6 Elongase ist in SEQUENZ ID NO. 29 dargestellt, die der delta 6 Desaturase aus Physcomitrella in SEQUENZ ID NO: 30 und die der delta-5 Desaturase aus Phaeodactylum tricornutum in SEQUENZ ID NO: 31.

40

45

Tabelle 5: Kombinationen von Desaturasen und Elongasen

	Gen Plasmid	Δ -6-Desaturase	Δ -5-Desaturase	Δ -6-Elongase
5	1 PUT-ED	Pp_des6	---	Pp_PSE1
	2 pARA1	Pt_des6	Pt_des5	Pp_PSE1
	3 pARA2	Pt_des6	Ce_des5	Pp_PSE1
	4 pARA3	Pt_des6	Ce_des5	Pp_PSE1
	5 pARA4	Ce_des6	Ce_des5	Ce_PSE1
10	6 PBDHGLA	Pt_des6	---	Pp_PSE1
	7 PBARAI	Pt_des6	Pt_des5	Pp_PSE1

Plasmide 1 bis 5 sind pUC Derivate, Plasmide 6 bis 7 sind binäre Pflanzentransformationsvektoren

- 15 Pp = *Physcomitrella patens*, Pt = *Phaeodactylum tricornutum*
 Pp_PSE1 entspricht der Sequenz aus SEQ ID NO: 9.
 PSE = PUFA spezifische Δ -6-Elongase
 Ce_des5 = Δ -5-Desaturase aus *Caenorhabditis elegans* (Genbank Acc. Nr. AF078796)
- 20 Ce_des6 = Δ -6-Desaturase aus *Caenorhabditis elegans elegans*
 (Genbank Acc. Nr. AF031477, Basen 11-1342)
 Ce_PSE1 = Δ -6-Elongase aus *Caenorhabditis elegans* (Genbank Acc. Nr. AF244356, Basen 1-867)
- 25 Auch weitere Desaturasen oder Elongasegensequenzen können in Expressionskassetten beschriebener Art inseriert werden wie z.B. Genbank Acc. Nr. AF231981, NM_013402, AF206662, AF268031, AF226273, AF110510 oder AF110509.
- 30 iii) Transfer von Expressionskassetten in Vektoren zur Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* und zur Transformation von Pflanzen
- 35 Chimäre Genkonstrukte auf Basis der in pUC19 beschriebenen können mittels AscI in den binären Vektor pGPTV inseriert. Die multiple Klonierungssequenz wird zu diesem Zweck um eine AscI Schnittstelle erweitert. Zu diesem Zweck wird der Polylinker als zwei doppelsträngige Oligonukleotide neu synthetisiert, wobei eine zusätzliche AscI DNA Sequenz eingefügt wird. Das Oligonukleotid
- 40 wird mittels EcoRI und HindIII in den Vektor pGPTV inseriert. Es entsteht das Plasmid pGPTV+AscI. Die notwendigen Kloniertechniken sind dem Fachmann bekannt und können einfach wie in Beispiel 1 beschrieben nachgelesen werden.

93

Beispiel 12: *In vivo*-Mutagenese

Die *in vivo*-Mutagenese von Mikroorganismen kann mittels Passage der Plasmid- (oder einer anderen Vektor-) DNA durch *E. coli* oder andere Mikroorganismen (z.B. *Bacillus* spp. oder Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae*), bei denen die Fähigkeiten, die Unversehrtheit ihrer genetischen Information aufrechtzuerhalten, gestört ist, erfolgen. Übliche Mutator-Stämme haben Mutationen in den Genen für das DNA-Reparatursystem (z.B. *mutHLS*, *mutD*, *mutT* usw.; als Literaturstelle siehe Rupp, W.D. (1996) DNA repair mechanisms, in: *Escherichia coli* and *Salmonella*, S. 2277-2294, ASM: Washington). Diese Stämme sind dem Fachmann bekannt. Die Verwendung dieser Stämme ist beispielsweise in Greener, A., und Callahan, M. (1994) *Strategies* 7:32-34, erläutert. Der Transfer mutierter DNA-Moleküle in Pflanzen erfolgt vorzugsweise nach Selektion und Test der Mikroorganismen. Transgene Pflanzen werden nach verschiedenen Beispielen im Beispielteil dieses Dokumentes erzeugt.

20 Beispiel 13: Untersuchung der Expression eines rekombinanten Genproduktes in einem transformierten Organismus

Die Aktivität eines rekombinanten Genproduktes im transformierten Wirtsorganismus kann auf der Transkriptions- und/oder der Translationsebene gemessen werden.

Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Menge an Transkription des Gens (ein Hinweis auf die Menge an RNA, die für die Translation des Genproduktes zur Verfügung steht) ist die Durchführung eines Northern-Blots wie unten ausgeführt (als Bezugsstelle siehe Ausubel et al. (1988) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: New York, oder den oben erwähnten Beispielteil), wobei ein Primer, der so gestaltet ist, dass er an das Gen von Interesse bindet, mit einer nachweisbaren Markierung (gewöhnlich radioaktiv oder chemilumineszent) markiert wird, so dass, wenn die Gesamt-RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel aufgetrennt, auf eine stabile Matrix transferiert und mit dieser Sonde inkubiert wird, die Bindung und das Ausmaß der Bindung der Sonde das Vorliegen und auch die Menge der mRNA für dieses Gen anzeigt. Diese Information zeigt den Grad der Transkription des transformierten Gens an. Zelluläre Gesamt-RNA kann aus Zellen, Geweben oder Organen mit mehreren Verfahren, die alle im Fachgebiet bekannt sind, wie zum Beispiel das von Bormann, E.R., et al. (1992) *Mol. Microbiol.* 6:317-326 beschriebene, präpariert werden.

Northern-Hybridisierung

- Für die RNA-Hybridisierung wurden 20 µg Gesamt-RNA oder 1 µg poly(A)⁺-RNA mittels Gelelektrophorese in Agarosegelen mit
- 5 einer Stärke von 1,25 % unter Verwendung von Formaldehyd, wie beschrieben in Amasino (1986, Anal. Biochem. 152, 304) aufgetrennt, mittels Kapillaranziehung unter Verwendung von 10 x SSC auf positiv geladene Nylonmembranen (Hybond N+, Amersham, Braunschweig) übertragen, mittels UV-Licht immobilisiert und
- 10 3 Stunden bei 68°C unter Verwendung von Hybridisierungspuffer (10 % Dextransulfat Gew./Vol., 1 M NaCl, 1 % SDS, 100 mg Heringsperma-DNA) vorhybridisiert. Die Markierung der DNA-Sonde mit dem Highprime DNA labeling-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) erfolgte während der Vorhybridisierung unter Verwendung von
- 15 alpha-³²P-dCTP (Amersham, Braunschweig, Deutschland). Die Hybridisierung wurde nach Zugabe der markierten DNA-Sonde im gleichen Puffer bei 68°C über Nacht durchgeführt. Die Waschschriffe wurden zweimal für 15 min unter Verwendung von 2 X SSC und zweimal für 30 min unter Verwendung von 1 X SSC, 1 % SDS, bei 68°C durch-
- 20 geführt. Die Exposition der verschlossenen Filter wurde bei -70°C für einen Zeitraum von 1 bis 14 T durchgeführt.

- Zur Untersuchung des Vorliegens oder der relativen Menge an von dieser mRNA translatiertem Protein können Standardtechniken, wie
- 25 ein Western-Blot, eingesetzt werden (siehe beispielsweise Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York). Bei diesem Verfahren werden die zellulären Gesamt-Proteine extrahiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Matrix, wie Nitrozellulose, übertragen und mit einer
- 30 Sonde, wie einem Antikörper, der spezifisch an das gewünschte Protein bindet, inkubiert. Diese Sonde ist gewöhnlich mit einer chemilumineszenten oder kolorimetrischen Markierung versehen, die sich leicht nachweisen lässt. Das Vorliegen und die Menge der beobachteten Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge des
- 35 gewünschten, in der Zelle vorliegenden mutierten Proteins an.

Beispiel 14: Analyse der Auswirkung der rekombinanten Proteine auf die Produktion des gewünschten Produktes

- 40 Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, Algen, Ciliaten oder auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen)
- 45 gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. von Lipiden oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese Analyse-

95

- techniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
- 5 (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III:
- 10 "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988)
- 15 Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).
- 20 Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben
- 25 bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford:
- 30 Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

- Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu ana-
- 35 lysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamteffizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere
- 40 Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F.
- 45 Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192

96

(ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, 5 Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromatographie).

Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäure-
10 produkten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromato-
15 graphie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das
20 Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl-
25 und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 Mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min
30 und 5 min bei 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.

35 Bei Fettsäuren, für die keine Standards verfügbar sind, muss die Identität über Derivatisierung und anschließende GC-MS-Analyse gezeigt werden. Beispielsweise muss die Lokalisierung von Fettsäuren mit Dreifachbindung über GC-MS nach Derivatisierung mit 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998, siehe oben)
40 gezeigt werden.

97

Expressionskonstrukte in heterologen mikrobiellen Systemen

Stämme, Wachstumsbedingungen und Plasmide

- 5 Der *Escherichia coli*-Stamm XL1 Blue MRF' kan (Stratagene) wurde zur Subklonierung der neuen Desaturase pPDesaturase1 aus *Physcomitrella patens* verwendet. Für die funktionelle Expression dieses Gens verwendeten wir den *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm INVSc 1 (Invitrogen Co.). *E. coli* wurde in Luria-Bertini-Brühe (LB,
- 10 Duchefa, Haarlem, Niederlande) bei 37°C kultiviert. Wenn nötig, wurde Ampicillin (100 mg/Liter) zugegeben, und 1,5 % Agar (Gew./Vol.) wurde für feste LB-Medien hinzugefügt. *S. cerevisiae* wurde bei 30°C entweder in YPG-Medium oder in komplettem Minimalmedium ohne Uracil (CMdum; siehe in: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston,
- 15 R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.B., Coen, D.M., und Varki, A. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York) mit entweder 2 % (Gew./Vol.) Raffinose oder Glucose kultiviert. Für feste Medien wurden 2 % (Gew./Vol.) Bacto™-Agar (Difco)
- 20 hinzugefügt. Die zur Klonierung und Expression verwendeten Plasmide sind pUC18 (Pharmacia) und pYES2 (Invitrogen Co.).

Beispiel 16: Klonierung und Expression PUFA-spezifischer
Desaturasen aus *Phaeodactylum tricornutum*

25

- Für die Expression in Hefe wurden die *Phaeodactylum tricornutum* -cDNA-Klone aus Seq ID NO: 1, 3, 5 oder 11 bzw. die Sequenzen aus SEQ ID NO: 7 oder 9 bzw andere gewünschte Sequenzen zuerst so modifiziert, dass lediglich die Codierregion mittels Polymerase
- 30 Kettenreaktion unter Zuhilfenahme zweier Oligonukleotide amplifiziert werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass eine Konsensussequenz vor dem Startcodon zur effizienten Translation eingehalten wurde. Entweder wurde hierzu die Basenfolge ATA oder AAA gewählt und vor das ATG in die Sequenz eingefügt (Kozak, M.
- 35 (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes, Cell 44, 283-292). Vor diesem Konsensustriplett wurde zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle eingeführt, die kompatibel sein muss zur Schnittstelle des Zielvektors,
- 40 in den das Fragment kloniert werden soll und mit dessen Hilfe die Genexpression in Mikroorganismen oder Pflanzen erfolgen soll.

98

Die PCR-Reaktion wurde mit Plasmid-DNA als Matrize in einem Thermocycler (Biometra) mit der Pfu-DNA-(Stratagene) Polymerase und dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt: 3 min bei 96°C, gefolgt von 30 Zyklen mit 30 s bei 96°C, 30 s bei 55°C und 2 min bei 72°C, 1 Zyklus mit 10 min bei 72°C und Stop bei 4°C. Die Anlagerungstemperatur wurde je nach gewählten Oligonukleotiden variiert. Pro Kilobasenpaare DNA ist von einer Syntheszeit von etwa einer Minute auszugehen. Weitere Parameter, die Einfluss auf die PCR haben wie z.B. Mg-Ionen, Salz, DNA Polymerase etc., sind dem Fachmann auf dem Gebiet geläufig und können nach Bedarf variiert werden.

Die korrekte Größe des amplifizierten DNA-Fragments wurde mittels Agarose-TBE-Gelelektrophorese bestätigt. Die amplifizierte DNA wurde aus dem Gel mit dem QIAquick-Gelextraktionskit (QIAGEN) extrahiert und in die SmaI-Restriktionsstelle des dephosphorylierten Vektors pUC18 unter Verwendung des Sure Clone Ligations Kit (Pharmacia) ligiert, wobei die pUC-Derivate erhalten wurden. Nach der Transformation von E. coli XL1 Blue MRF' kan wurde eine DNA-Minipräparation (Riggs, M.G., & McLachlan, A. (1986) A simplified screening procedure for large numbers of plasmid mini-preparation. BioTechniques 4, 310-313) an ampicillinresistenten Transformanden durchgeführt, und positive Klone mittels BamHI-Restriktionsanalyse identifiziert. Die Sequenz des klonierten PCR-Produktes wurde mittels Resequenzierung unter Verwendung des ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) bestätigt.

Δ5 Acyl Lipid desaturase, Pt_des5

Primer 1 GAG CTC ACA TAA TGG CTC CGG ATG CGG ATA AGC
Primer 2 CTC GAG TTA CGC CCG TCC GGT CAA GGG

Das PCR-Fragment (1428bp) wurde mithilfe des Sure Clone Kit (Pharmacia) in pUC 18 kloniert, das inserierte Fragment SacI/XhoI verdaut und das Fragment mithilfe entsprechender Restriktionsschnittstellen in pYES2 oder pYES6 inseriert.

Δ6 Acyl Lipid desaturase, Pt_des6

Primer 3 GGA TCC ACA TAA TGG GCA AAG GAG GGG ACG CTC GGG
Primer 4 CTC GAG TTA CAT GGC GGG TCC ATC GGG

Das PCR-Fragment (1451 bp) wurde mithilfe des Sure Clone Kit (Pharmacia) in pUC 18 kloniert, das inserierte Fragment BamHI/XhoI verdaut und das Fragment mithilfe entsprechender Restriktionsschnittstellen in pYES2 oder pYES6 inseriert.

99

$\Delta 12$ Acyl Lipid desaturase, Pt_des12

Primer 5 GGA TCC ACA TAA TGG TTC GCT TTT CAA CAG CC

Primer 6 CTC GAG TTA TTC GCT CGA TAA TTT GC

5 $\Delta 12$ Acyl Lipid desaturase, Pt_des12.2

Primer 7 GGA TCC ACA TAA TGG GTA AGG GAG GTC AAC G

Primer 8 CTC GAG TCA TGC GGC TTT GTT TCG C

Das PCR Fragment (1505bp) wurde mithilfe des Sure Clone

- 10 Kit (Pharmacia) in pUC 18 kloniert, das inserierte Fragment BamHI/XhoI verdaut und das Fragment mithilfe entsprechender Restriktionsschnittstellen in pYES2 oder pYES6 inseriert.

Die Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsenzym/en passend zur

- 15 eingeführten Schnittstelle der Primersequenz gespalten und das erhaltene Fragment in die kompatiblen Restriktionsstellen des dephosphorylierten Hefe-E. coli-Shuttlevektors pYES2 oder pYES6 ligiert, wobei pYES-Derivate erhalten werden. Nach der Transformation von E. coli und DNA-Minipräparation aus den
- 20 Transformanden wurde die Orientierung des DNA-Fragments im Vektor durch geeignete Restriktionsspaltung oder Sequenzierung überprüft. Ein Klon wurde für die DNA-Maxipräparation mit dem Nucleobond® AX 500 Plasmid-DNA-Extraktionskit (Macherey-Nagel, Düringen) angezogen.

25

Saccharomyces cerevisiae INVSc1 wurde mit den pYES-Derivaten und pYES Leervektor mittels eines PEG/Lithiumacetat-Protokolls transformiert (Ausubel et al., 1995). Nach der Selektion auf CMDum-Agarplatten mit 2 % Glucose wurden pYES-Derivate-

- 30 Transformanden und eine pYES2-Transformande zur weiteren Anzucht und funktionellen Expression ausgewählt. Bei pYES6-Derivaten wurde Blastidicin als Antimetabolit verwendet. Im Fall von Coexpressionen auf Basis von pYES2 und pYES6 wurde auf Minimal-medium mit Blastidicin selektiert.

35

Funktionelle Expression einer Desaturaseaktivität in Hefe

Vorkultur

- 40 20 ml CMDum-Flüssigmedium ohne Uracil aber mit 2 % (Gew./Vol.) Raffinose wurden mit den transgenen Hefeklonen (pYES2) angeimpft und 3 Tage bei 30°C, 200 rpm gezüchtet, bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 1,5 bis 2 erreicht wurde. Wurde als Vektor pYES6 verwendet, so wurde zusätzlich auf Blastidicin als Anti-
- 45 metabolit selektioniert.

100

Hauptkultur

Für die Expression wurden 20 ml CMdum-Flüssigmedium ohne Uracil aber mit 2 % Raffinose und 1 % (Vol./Vol.) Tergitol NP-40

- 5 mit Fettsäuresubstraten auf eine Endkonzentration von 0,003 % (Gew./Vol.) angereichert. Die Medien wurden mit den Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Die Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,2 mit 2 % (Gew./Vol.) Galaktose für 16 Std. induziert, wonach die Kulturen eine OD₆₀₀ von 0,8-1,2 geerntet wurden.

10

Fettsäureanalyse

- Die Gesamt-Fettsäuren wurden aus Hefekulturen extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Davon wurden Zellen von 5
- 15 ml Kultur mittels Zentrifugation (1000 x g, 10 min, 4°C) geerntet und einmal mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0, gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Zur Herstellung des Fettsäuremethylester (FAMES oder Singular FAME) wurden die Zellsedimente mit 1 M methanolischer H₂SO₄ und 2 % (Vol./Vol.)
- 20 Dimethoxypropan für 1 Std. bei 80°C behandelt. Die FAMES wurden zweimal mit 2 ml Petrolether extrahiert, einmal mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0, und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das organische Lösungsmittel wurde unter einem Argonstrom verdampft, und die FAMES wurden in 50 mikrol Petrol-
- 25 ether gelöst. Die Proben wurden auf einer ZEBRON-ZB-Wax-Kapillarsäule (30 m, 0,32 mm, 0,25 mikro m; Phenomenex) in einem Hewlett Packard-6850-Gaschromatograph mit einem Flammenionisationsdetektor aufgetrennt. Die Ofentemperatur wurde von 70°C (1 min halten) bis 200°C mit einer Rate von 20°C/min, dann auf 250°C
- 30 (5 min halten) mit einer Rate von 5°C/min und schließlich auf 260°C mit einer Rate von 5°C/min programmiert. Stickstoff wurde als Trägergas verwendet (4,5 ml/min bei 70°C). Die Fettsäuren wurden durch Vergleich mit Retentionszeiten von FAME-Standards (SIGMA) identifiziert.

35

Expressionsanalyse

- Die Verhältnisse der zugegebenen und aufgenommenen Fettsäuresubstrate wurden ermittelt und so Quantität und Qualität der
- 40 Desaturasereaktion gemäß Tabelle 6, Tabelle 7 und Tabelle 8 erfasst.

Ergebnis der Expression einer *Phaeodactylum tricornutum* Δ-6-Acyl Lipid Desaturase in Hefe:

45

101

Tabelle 6

Fettsäure		pYes2	pYes2-Ptd6 gefüttert mit		
		-	-	+18:2	+18:3
5	16:0	13,3	18,9	28,4	16,7
	16:1Δ9	45,4	44,7	12,5	16,9
	16:2Δ6,9	-	4,3	-	-
	18:0	4,9	6,3	10,4	9,1
	18:1Δ9	36,4	24,1	6,8	11,8
	18:2Δ6,9	-	1,8	-	-
10	18:2Δ9,12	-	-	33,4	-
	18:3Δ6,12,15	-	-	4,9	-
	18:3Δ9,12,15	-	-	-	43,1
	18:4Δ6,9,12,15	-	-	-	2,3

15 Die Angaben stellen Mol-% entsprechender cis-Fettsäuren dar.

Ergebnis der Expression einer *Phaeodactylum tricornutum* Δ-5-Acyl Lipid Desaturase in Hefe:

20 Tabelle 7

Fett- säure		pYES2	pYES_Ptd5-Konstrukt gefüttert mit							
		Leer	Kon- trolle	18:2	18:3	20:1	-20:1	20:2	20:3	20:3
						Δ8	Δ11	Δ11,14	Ω3	Ω6
25	16:0Δ	16,9	20,4	27,7	24,4	16,2	21	17,6	19,5	22,8
	16:1Δ9	44,7	44,1	13,2	9,6	37,4	39,4	38,3	36,9	30,7
	18:0	6,1	6,9	10,54	9,8	4,7	7,9	6,3	6,8	8,2
	18:1 Δ9	31,72	28,1	8,77	6	15	26	29,5	25,6	21,1
30	18:2 Δ5,9		0,17	0	0	0	0,09	0,21	0,09	9
	18:2 Δ9,12	-		39,7	-	-	-	-	-	-
	18:3 Δ9,12,15	-			49,9	---	-	-	-	-
	20:1 Δ8	-			-	25,5	-	-	-	-
	20:1 Δ11	-			-	-	5,41	-	-	-
35	20:2 Δ5,11	-			-	-	0,21	-	-	-
	20:2 Δ11,14	-	-	-	-	-	-	6,48	-	-
	20:3 Δ5,11,14	-			-	-	-	0,76	-	-
	20:3 Δ11,14,17	-	-	-	-	-	-	-	9,83	-
	20:3 Δ8,11,14	-	-	-	-	-	-	-	-	13,69
40	20:4 Δ5,11,14,17	-	-	-	-	-	-	-	1,16	-
	20:4 Δ5,8,11,14	-	-	-	-	-	-	-	-	3,08

Die Angaben stellen Mol-% Fettsäuren von cis-Fettsäuren dar.

102

Aus weiteren Fütterungsversuchen wurde gefunden, dass C18:1 Δ 9 in der Anwesenheit von C18:2 Δ 9,11 oder C18:3 Δ 9,12,15 oder C20:1 Δ 8 Fettsäuren nicht desaturiert wurde während in Anwesenheit von C20:1 Δ 11, C20:2 Δ 11,14 und C20:3 Δ 8,11,14 auch C18:1 desaturiert wird. Ebenfalls keine Desaturierung erfolgte in Anwesenheit von C20:3 Δ 8,11,14.

Bei Nutzung des Protease-defizienten Hefestammes C13BYS86 (Kunze I. et al., Biochemica et Biophysica Acta (1999) 1410:287-298) für die Expression der Δ -5-Desaturase aus *Phaeodactylum tricornutum* auf Vollmedium mit Blasticidin wurde gefunden, dass C20:4 Δ 8,11,14,17 als Substrat der Δ -5-Desaturase mit 20 % Umsatzrate ebenso gut umgesetzt wurde wie C20:3 Δ 8,11,14. Alternativ können auch die Auxotrophiemarker leu2, ura3 oder his für Genexpression genutzt werden.

In einem weiteren Coexpressionsexperiment von Δ -5 Desaturase aus *Phaeodactylum* und Δ -6 Elongase aus *Physcomitrella* wurde der Stamm UTL7A (Warnecke et al., J. Biol. Chem. (1999) 274(19):13048-13059) benutzt, wobei die Δ -5 Desaturase ca 10 % C20:3 Δ 8,11,14 zu C20:4 Δ 5,8,11,14 umsetzte.

Weitere Fütterungsexperimente mit verschiedensten anderen Fettsäuren allein oder in Kombination (z.B. Linolsäure, 20:3 Δ -5,11,14-Fettsäure, alpha- oder gamma Linolensäure, Stearidonsäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure etc.) können zur detaillierteren Bestätigung der Substratspezifität und -Selektivität dieser Desaturasen durchgeführt werden.

Tabelle 8: Ergebnis der Coexpression einer *Phaeodactylum tricornutum* Δ -5-Acyl Lipid Desaturase und einer Δ -6 Elongase aus Moos in Hefe auf Basis der Expressionsvektoren pYes2 und pYes6

35	pYes2-Elo		pYes2-Elo and pYes6-Ptd5	
	+18:3	+18:4	+18:3	+18:4
16:0	15,0	14,8	15,6	15,1
16:1 Δ 9	27,7	29,2	27,5	29,0
18:0	5,6	6,3	5,7	6,4
40 18:1 Δ 9	17,1	30,8	27,4	31,6
18:3 Δ 6,9,12	7,60	-	7,8	-
18:4 Δ 6,9,12,15	-	6,71	-	6,4
20:3 Δ 8,11,14	15,92	-	13,55	-
45 20:4 Δ 5,8,11,14	-	-	1,31	-
20:4 Δ 8,11,14,17	-	11,4	-	10,31
20:5 Δ 5,8,11,14,17	-	-	-	0,53

103

Aus den Substratumsetzungen geht hervor, dass die verwendete Δ -5-Desaturase aus *Phaeodactylum* und die Δ -6-Elongase aus *Physcomitrella patens* bzgl. der Substrataktivität und insbesondere der Substratspezifität geeignet sind, um Arachidon-
15 säure bzw. Eicosapentaensäure mithilfe erfindungsgemäßer Sequenzen zu produzieren.

Die Fragmentierungsmuster und Massenspektren von DMOX-Derivaten von Standards als auch den Peakfraktionen per GC identifizierter
10 Fettsäuren der in Tabelle 6, 7 und 8 aufgeführten, zeigen vergleichsweise identische Ergebnisse, wodurch die jeweilige Position der Doppelbindung über die bloße GC-Detektion hinaus abgesichert wurde.

15 Beispiel 17: Reinigung des gewünschten Produktes aus transformierten Organismen

Die Gewinnung des gewünschten Produktes aus Pflanzenmaterial oder Pilzen, Algen, Ciliaten, tierischen Zellen oder aus dem Überstand
20 der vorstehend beschriebenen Kulturen kann durch verschiedene, im Fachgebiet bekannte Verfahren erfolgen. Wird das gewünschte Produkt nicht aus den Zellen sezerniert, können die Zellen aus der Kultur durch langsame Zentrifugation geerntet werden, die Zellen können durch Standardtechniken, wie mechanische Kraft oder
25 Ultraschallbehandlung, lysiert werden. Organe von Pflanzen können mechanisch von anderem Gewebe oder anderen Organen getrennt werden. Nach der Homogenisation werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt, und die Überstandsfraction, welche die löslichen Proteine enthält, wird zur weiteren Reinigung
30 der gewünschten Verbindung aufbewahrt. Wird das Produkt aus gewünschten Zellen sezerniert, werden die Zellen durch langsame Zentrifugation aus der Kultur entfernt, und die Überstandsfraction wird zur weiteren Reinigung aufbewahrt.

35 Die Überstandsfraction aus jedem Reinigungsverfahren wird einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Molekül entweder auf dem Chromatographieharz zurückgehalten wird, viele Verunreinigungen in der Probe jedoch nicht, oder die Verunreinigungen auf dem Harz zurückbleiben, die Probe
40 hingegen nicht. Diese Chromatographieschritte können wenn nötig wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl geeigneter Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung für ein bestimmtes zu reinigendes Molekül bewandert. Das
45 gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

104

Im Fachgebiet ist ein breites Spektrum an Reinigungsverfahren bekannt, und das vorstehende Reinigungsverfahren soll nicht beschränkend sein. Diese Reinigungsverfahren sind zum Beispiel beschrieben in Bailey, J.E., & Ollis, D.F., Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill: New York (1986).

Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindungen kann durch Standardtechniken des Fachgebiets bestimmt werden. Dazu gehören Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, insbesondere Dünnschichtchromatographie und Flammenionisationsdetektion (IATROSCAN, Iatron, Tokio, Japan), NIRS, Enzymtest oder mikrobiologisch. Eine Übersicht über diese Analyseverfahren siehe in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11:27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A., et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

Äquivalente

Der Fachmann erkennt oder kann viele Äquivalente der hier beschriebenen erfindungsgemäßen spezifischen Ausführungsformen feststellen, indem er lediglich Routineexperimente verwendet. Diese Äquivalente sollen von den Patentansprüchen umfasst sein.

35

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Fettsäureestern mit einem
5 erhöhtem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit
mindestens zwei Doppelbindungen dadurch gekennzeichnet, daß
man mindestens eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der
Gruppe
- 10 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1,
SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dar-
gestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des degenerierten
15 genetischen Codes durch Rückübersetzung der in
SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder
SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen
erhalten werden,
- 20 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5
oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die
für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4,
SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäure-
25 sequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf
Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische
Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist,
- in einen Fettsäureester produzierenden Organismus einbringt,
anzieht und die in dem Organismus enthaltenen Fettsäureester
30 isoliert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die durch das Verfahren
hergestellten Fettsäureester mehrfach ungesättigte C₁₈-, C₂₀-
oder C₂₂-Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen
35 im Fettsäureester enthalten.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die C₁₈-, C₂₀- oder
C₂₂-Fettsäuremoleküle aus dem Organismus in Form eines Öls,
Lipids isoliert werden.
40
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, wobei der Organismus
ein Mikroorganismus, ein Tier oder eine Pflanze ist.

106

5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, wobei der Organismus eine transgene Pflanze ist.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, wobei die Fettsäure-
5 ester C₁₈-, C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuren mit drei, vier oder fünf Doppelbindungen im Fettsäureester enthalten.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekenn-
zeichnet, daß man die in den Fettsäureestern enthaltenden
10 mehrfach ungesättigten Fettsäuren freisetzt.
8. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:
 - 15 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
 - b) Nukleinsäuresequenzen, die aufgrund des degenerierten
20 genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen erhalten werden,
 - 25 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf
30 Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.
9. Aminosäuresequenz codiert durch eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 8.
35
10. Aminosäuresequenz nach Anspruch 9, codiert durch die in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 11 dargestellte Sequenz.
- 40 11. Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 8, wobei die Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.
12. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 11, wobei im Nuklein-
45 säurekonstrukt zusätzliche zusätzliche Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthalten sind.

107

13. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 11 oder 12, wobei als Biosynthesegen des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels im Nukleinsäurekonstrukt ein Gen ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) enthalten ist.
14. Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 8 oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 11.
15. Organismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 8, mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 11 oder mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 14.
16. Organismus nach Anspruch 15, wobei es sich bei dem Organismus um eine Pflanze, einen Mikroorganismus oder ein Tier handelt.
17. Transgene Pflanze enthaltend eine funktionelle oder nicht funktionelle Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 8, ein funktionelles oder nicht funktionelles Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 11 oder einen funktionellen oder nicht funktionellen Vektor gemäß Anspruch 14.
18. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 8 oder eines Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 11 zur Herstellung von transgenen Pflanzen.
19. Antikörper, der spezifisch ein Polypeptid, das von einer der Nukleinsäuren gemäß Anspruch 8 codiert wird, bindet.
20. Antisense-Nukleinsäuremolekül, das die Komplementärsequenz der Nukleinsäure gemäß Anspruch 8 umfasst.
21. Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon, hergestellt durch das Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 7.
22. Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung, die Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon gemäß Anspruch 21 enthalten.

108

23. Verwendung der Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon gemäß Anspruch 21 oder der Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung gemäß Anspruch 22 in Futter, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.
- 5
24. Verfahren zur Identifikation eines Antagonisten oder Agonisten von Desaturasen, umfassend
- 10 a) in Kontaktbringen der Zellen, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung exprimieren, mit einem Kandidatenstoff;
- b) Testen der Desaturase-Aktivität;
- 15 c) Vergleichen der Desaturase-Aktivität mit einer Standardaktivität in Abwesenheit des Kandidatenstoffs, wobei ein Anstieg der Desaturase-Aktivität über den Standard anzeigt, daß der Kandidatenstoff ein Agonist und ein Verringerung der Desaturase-Aktivität anzeigt, daß der
- 20 Kandidatenstoff ein Antagonist ist.
25. Kit, umfassend die Nukleinsäure gemäß Anspruch 8, das Nukleinsäurekonstrukt nach den Ansprüchen 11 bis 13, den Antikörper gemäß Anspruch 19, das Antisense-Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 20, einen Antagonisten oder Agonisten identifiziert gemäß Anspruch 24, die Zusammensetzung nach Anspruch 27, die Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 9.
- 25
26. Kit nach Anspruch 25 enthaltend Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon gemäß Anspruch 21 oder Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung gemäß Anspruch 22.
- 30
27. Zusammensetzung, enthaltend den Antikörper gemäß Anspruch 19, das Antisense-Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 20
- 35 oder einen Antagonisten oder Agonisten identifiziert gemäß Anspruch 24.

40

45

Figur 1: Polypeptidvergleich der Codierregionen von Pp_des 6 (obere Reihe) mit der EST-Sequenz von PT001078032R (untere Reihe)

```

398 WKPLVWMAVTELMMSGMLLGFVFLSHNGMEVYNSSKEFVSAQI-----VSTR 444
    W+   + + +   + L  +F LSHN   + S+   +A +               V T
430 WRVFGNIMLMGVAESLALAVLFSLSHN----FESADRDPTAPLKKTGEPVDWFKTQVETS 263
445 DIKGNIFNDWFTGGLNRQIEHHLFPTMPRHNLNKIAPRVEVFCKKHGLVY 494
    G   +   FTGGLN Q+EHHLFP M           IAP+V   C KHG+ Y
262 CTYGGFLSGCFTGGLNFQVEHHLFPRMSSAWYXYIAPKVREICAKHGVHY 113

```

Figur 2: Polypeptidvergleich von Codierregionen der Ma_des12 (obere Sequenz) mit PT001070010R

```

105 GVWVLAHECGHQSFSTSKTLNN 126
    G WVLAHECGH +FS .+++L +
533 GFWVLAHECGHGAFSKNRSLOD 598

```

Figur 2a: Polypeptidvergleich von Codierregionen der Ma_des12 (obere Sequenz) mit PT001072031R

```

117 SFSTSKTLNNTVGVILHSMLLVPHYHSWRISHSKHH 151
    ++S S+T N+ VG+I+H LLVPY +W+ +H+KHH
465 AYSDSQTFNDVVGFIVHQALLVPYFAWQYTHAKHH 569

```

Figur 3: Polypeptidvergleich von Codierregionen eines PCR Produktes aus Primerpaar F6a und R4a2 codierend für ein Desaturase Fragment, (obere Reihe) aus *Phaodactylum* mit der Sequenz T36617 aus *Streptomyces coelicolor* (untere Reihe)

```

1   WWKNKHNGHHAVPNLHCSSAVAQDGDPDIDTMPLLAWSVQQAQSYRELQADGKDSGLVKF 60
    WW++KH  HHA PN      +D DPDI   LL WS  QA++           +GL +
114 WWQDKHTRHHANPN-----TEDLDPDIGP-DLLVWSPDQARAA-----TGLPRL 156
61  MIRNQSYFYFPILLRLSWLNESFKCAFGGLGAASENAALELKAKGLQYPLLEKAGILLH 120
    + R Q++ +FP+L L      E F      G A  N  L+ +A      L+ A +L H
157 LGRWQAFLLFFPLLT-----EGFNLHVASGRAMANRRLLKRR-----LDGALLLAH 202
121 YAWMLTVSSGFGRXXXXXXXXXXXXXXXXXCGFLLAIVFGLGHNGMATYNADARPDFWKLQ 180
    A LT   F              G L   F   H GM   AD RPDF + Q
203 CAVYLTAL--FWVLPPGMAIAFLAVHQCLFGVYLGSAFAPNHKGMPILTADDRPDFLRRQ 260
181 VTTTRNVTGGHGFPQAFVDWFCGGLQYQVDHHLFPS 216
    V T+RNV GG      F D   GGL +Q++HHLFPS
261 VLTSRNVNGG-----LFTDLALGGLNHQIEHHLFPS 291

```

2/5

Figur 4: Polypeptidvergleich von Codierregionen aus Pp_des6
(obere Reihe) verglichen mit Pt_des6 (untere Reihe)

```

51 KRLTSKKRVSESAAVQCISAEVQRNSSTQGTAEALAESVVKPTRRRSSQW 100
      . |   |.
1  .....MGKGGDARASKG 12
      .
101 KKSTHPLS..EVAVHNKPSDCWIVVKNKVYDVSNFADHPGGSVISTYFG 148
      . :| || | | ||: |||||. |||||.|| |: |
13 STAARKISWQEVKTHASPEDAWIHSNKKVYDVSNW.HEHPGGAVIFTHAG 61
      .
149 RDGTDVFSSFHAASTWKILQDFYIGDV..ERVEPTPELL...KDFREMRA 193
      | ||:|..||| . ::. ||||: . |   |: : | :|:|.
62 DDMTDIFAAFHAPGSQSLMKKFYIGELLPETTGKEPQQIAFEKGYRDLRS 111
      .
194 LFLREQLFKSSKLYYVMKLLTNVAIFAASIAIICWSKTISAVLASACMMA 243
      : :|||. | :|| | |.|.|||. |:: :|   |||| |:
112 KLIMMGMFKSNKWFYVYKCLSNMAIWAACALVFYSDRFVHVLASAVMLG 161
      .
244 LCFQQCGWLSHDFLHNQVFETRNLNEVVGIVIGNAVLGFSTGWWKEKHNL 293
      ||| |||.|||||.||| |   :. |   || . |:| ||| |||
162 TFFQQSGWLAHDFLHHQVFTKRKHGDLGGLFWGNLMQGYSVQWWKNKHNG 211
      .
294 HHAAPN.ECDQTY.QPIDEDIDTLPLIAWS.....KDILATVENKTFL 334
      ||| || |   | | ||||:|:| ||   ::| ..
212 HHAVPNLHCSSAVAQDGDPDIDTMPLLAWSVQQAQSYRELQADGKDSGLV 261
      .
335 R.ILQYQHLFFMGLLFFARGSWLFWSWR.....YTSTAVLSPVDR... 373
      : ::. | |: :| || ||| |.: . | | :
262 KFMIRNQSYFYFPILLRLARLSWLNESFKCAFGLGAASENAALELKAKGLQ 311
      .
374 ..LLEKGTVLPHYFVFGTAC.YLLPGWKPLVWMAVTELMS.GMLLGFVF 419
      |||| :| || | . . : . . . | | || ||
312 YPLLEKAGILLHYAWMLTVSSGFGFRFSFAYTAFYFLTATASCGFLLAIVF 361
      .
420 VLSHNGMEVYNSS..KEFVSAQIVSTRDIKG.....NIFNDWFTGGLNRQ 462
      | |||| ||. :| |: .||.: |   | ||| ||| |
362 GLGHNGMATYNADARPDFWKLQVTTTRNVTGGHGFPQAFVDWFCGGLQYQ 411
      .
463 IEHHLFPTMPRHNLNKIAPRVEVFCKKHGLVYEDVSIATGTCKVLKALKE 512
      ::|||||.:||||| |   || |||. |. | : : || .|| |
412 VDHHLFPSLPRHNLAKTHALVESFCKEWGVQYHEADLVDGTMEVLHHLGS 461
      .
513 VAEAAAEQHATTS.... 525
      ||   |
462 VAGEFVVDFVRDGPAM. 477

```

3/5

Figur 5: Polypeptidvergleich von Codierregionen aus Pp_des6 (obere Reihe) verglichen mit Pt_des5 (untere Reihe)

```

51 KRLTSKKRVSESAAVQCISAEVQRNSSTQGTAEALAESVVKPTRRRSSQW 100
      :|  |  .|...
1  .....MAPDADKLRQRQTAV 16

101 KKSTHPLSEVAVHNKPSDC.....WIVVKNKVYDVSNFADEHPGGSVIS 144
      | |  . :  :  : :|} . } :|}| |
17 AK..HNAATISTQERLCSLSSLKGEEVCIDGIIYDLQSF..DHPGGETIK 62

145 TYFGRDGTDFVSSFHAASTWKILQDF.YIGDVERVEPTPELLKDF.REM. 191
      : | | | :  |  | | :  :| |  .  :| |}.
63 MFGGNDVTVQYKMIHPYHTEKHLEKMKRVGKVTDVFCYKFDTEFEREIK 112

192 RALFLREQLFKS.SKLYYVMKLLTNVAIFAASIAIICWSKT.ISAVLASA 239
      | .|  .  |  :  :  :|||  |  |  | .|| |
113 REVFKIVRRGKDFGTLGWFFRAFCYIAIF..FYLYQYHWVTTGTSWLLAVA 160

240 CMMALCFQCCGWLSDHFLHNQVFETRNLNEVVGIVIGNAVLGFSTGWWKE 289
      ..  . || |  .  |. :..| :|  :| |  |. |
161 YGISQAMIGMN.VQHDANHGATSKRPWVNDMLG..LGADFIGGSKWLWQE 207

290 KHNLHHAAPNECDQTYQPIDEDIDTLPLIAWSKDILATVENKTFLRILQY 339
      .|  ||| |  :  |  :  |:: .. |  :|. |  ::
208 QHWTTHAYTNHAEM..DP..DSFGAEPMLLFN.DYPLDHPARTWLH..RF 250

340 QHLFFMGLLFFARGSWLFWWR.....YTSTAVLS...PVDRLLEKGTVL 381
      | | :| .|  | ||  .  ||  .|
251 QAFFYMPVL...AGYWLSAVFNPIILDLOQRGALSVGIRLDNAFIHSRRK 297

382 FHYFW...FVG....TACYLLPG....WKPLVWMAVTELMGMLLGFVFW 420
      :  ||  ::  |  |  |:  .  .  :  |  .|
298 YAVFWRAVYIAVNVIAPFYTNLSGLEWSWRVFGNIMLMGVAESLALAVLFS 347

421 LSHN.....GMEVYNSSKEFVSAQIVSTRDIKGNIFNDWFTGGLN 460
      ||||  :.  :.  |||  |  .  |||||
348 LSHNFESADRDPTAPLKKTGEPVDWFKTQ.VETSCTYGGFLSGCFTGGLN 396

461 RQIEHHLFPTMPRHNLNKIAPRVEVFCKKHGLVYEDVS.IATGTCKVLKA 509
      |:||||| |  |||:|  | |||. |  |  :
397 FQVEHHLFPRMSSAWYPYIAPKVREICAKHGVHYAYYPWIHQNFLSTVRY 446

510 LKEVAEAAA.EQHATTS..... 525
      :  |  | |  .  |
447 MHAAGTGANWRQMARENPLTGRA. 469

```

Figur 6: Polypeptidvergleich von Codierregionen der Δ -12-Desaturase aus *Mortierella alpina* (Ma_des12) obere Reihe mit der homologen Sequenz aus *Phaeodactylum tricornutum* (Pt_des12) in der unteren Reihe

```

40 KEIRECIPAHCFERSGLRGLCHVAIDLTWASLL..FLAATQIDKFE..NP 85
   |:| | | | : | :.: | :| . | : : | |
107 KDLRAVIPKDCFEPTAKSLGYLSVS.TMGTILCSVVGANLLSVLDPSNP 155
      .
      .
      .
86 LIRYLAWPVYWIMQGIVCTGVWVLAHECGHQSFSTSKTLNNTVGVWILHSM 135
   | : | | . | | |.|||||||.|| :.:| . ||:|:|.
156 L.TWPLWAAYGAVTGTVMGLWVLAHECGHGAFSKNRSLODAVGYYIIHSI 204
      .
      .
      .
136 LLVPYHSWRISHSKHHKATGHMTKDQVFPKTRSQVGLPPKENAAAVQE 185
   :||| | |. | |. | |. | | : | | . | | . | |
205 MLVPYFSWQRSHAVHHQYTNHMELGETHVPDRADKEG....EKSLALRQF 250
      .
      .
      .
186 EDMSVHLDEEAPIVTLFWMVIQFLFGWPAYLIMNASGQDYGRWTSHFHTY 235
   | | . : : |||||:|. | | |. ||:
251 MLDSFGKDKGMKAYGGLQSFHLHLIVGWPAYLLIGATGGPDRGMTNHFYP. 299
      .
      .
      .
236 SPIFEP....RNFF.....DIIISDLGVLAALGALIYASMQLSLLTVTK 275
   .|: | : | : ||:|: |. ||| | . | |
300 NPLSTPTQPKKELFPGNWKEKVYQSDIGIAAVVGALIAWTATSGLAPVMA 349
      .
      .
      .
276 YYIVPYLFFVNFVLITFLQHTDPKLPHYREGAWNFORGALCTVDRSFGK 325
   | | : :| ||| |. ||||| |. ||: | | : ||| |:| | : |
350 LYGGPLIVINAWLVLYTLQHTDTPHVFSSDNHNFVKGALHTIDRPYDK 399
      .
      .
      .
326 .....FLDHMFHGIVHTHVAHHLFSQMPFYHAEATYHLKKLLGEYYVD 370
   :| : | | ||||| |. | | |: | | :| | |. ||
400 LDPWGIIDFLHHKIGTTHVAHHFDSTIPHYKAQIATDAIKAKFPEVLYD 449
      .
      .
      .
371 PSPIVVAVWRSFRECRFVEDQGDVVFFK 398
   |. || |. || : | || . || . |
450 PTPIPQAMWRVAKGCTAVEQRGDAWVWK 477

```

5/5

Figur 7: Polypeptidvergleich von Codierregionen der Δ -12-Desaturase aus *Mortierella alpina* (Ma_des12) obere Reihe mit der homologen Sequenz aus *Phaeodactylum tri-cornutum* Klon PT001072031R (Pt_des12.2) in der unteren Reihe.

```

      .       .       .       .       .
22  NSAKPAFERNYQLPEFTIKEIRECIPAHCFERSGLRGLCHVAIDL TWASL 71
      .| | . . :|| | :|: || ||:| | :. || |.
33  SSYNPLAKDSPELP..TKGQIKAVIPKECFQSAFWSTFYLMRDLAMAAA 80
      .       .       .       .       .
72  LFLAATQIDKFENP.....LIRYLAWPVYIMQIVCTGVWVLAHECGH 115
      .|: : | | | | | | : || |||.|||||
81  FCYGTSQVLSTDLPQDATLILPWALGWGVYAFWMGTILTGPWVVAHECGH 130
      .       .       .       .       .
116 QSFSTSKTLNNTVGWILHSMMLVPYHSWRISHSKHHKATGHMTKDQVFVP 165
      .:| |. | |. |||. | |||| |. |. |. |||: | |: : ||
131 GAYSDSQTFNDVVGFIVHQALLVPYFAWQYTHAKHRRRTNHLVDGESHPV 180
      .       .       .       .       .
166 KTRSQVGLPP..KENAAA VQEEDMSVHLDEEAPIVTLFWMVIQFLFGWP 213
      | | | |. |. | | | | : | | | | | |
181 STAKDNGLGPHNERNNSFYAAWHEAMG....DGAFVAVFQVWS..HLFVGWP 224
      .       .       .       .       .
214 AYLI.MNASGQ..DYGRW.....TSHFHTYSPIFEPRNFFDIIISDLG 253
      || : ..|. | | | | | | | | | | : | : |
225 LYLAGLASTGKLAHEGWLEERNAIADHFRPSSPMFPAKIRAKIALSSAT 274
      .       .       .       .       .
254 VLAALGALIYASMQLSLLTVTKYYIVPYLFVNFVWLVLITFLQHTDPKLP 303
      || | |:| |. | | :| || ||| |||| |. ||||| :||
275 ELAVLAGLLYVGTQVGHLPLVLLWYWGPTYTFVNAWLVLTYTLQHTDPSIPH 324
      .       .       .       .       .
304 YREGAWNFORGALCTVDRSFGKFLDHMFHGIVHTHVAHHLFSQMPFYHAE 353
      | | | |. :||| |:| | :| | | | | | | | | | :|||. |.
325 YGEGEWTWVKGALSTIDRDYGIF.DFFHHTIGSTHVVHHLFHEMPWYNAG 373
      .       .       .       .       .
354 EATYHLKKLLGE..YYVYDPSPIVVAVWRSFRECRFVEDQGDVVFFK 398
      || |. | | | | |. |. | | | :|| | :||
374 IATQKVKEFLEPQGLYNDPTPWYKAMWRIARTCHYVESNEGQYFK 420

```

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH

<120> Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter
Fettsäuren, neue Biosynthesegene sowie neue pflanzliche
Expressionskonstrukte

<130> 2000_873

<140> 2000_873

<141> 2000-12-22

<160> 31

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1652

<212> DNA

<213> Phaeodactylum tricornutum

<220>

<221> CDS

<222> (115)..(1524)

<400> 1

```

gacccaacaa acccaacaat cccaacaatc ccatcaacag gaattggggtt tcgttgagtc 60
aataattgct agaatccaaa cagacagaca gagaccaacc gcattctatta caga atg 117
                                         Met
                                         1

gct ccg gat gcg gat aag ctt cga caa cgc cag acg act gcg gta gcg 165
Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val Ala
          5              10              15

aag cac aat gct gct acc ata tcg acg cag gaa cgc ctt tgc agt ctg 213
Lys His Asn Ala Ala Thr Ile Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser Leu
          20              25              30

tct tcg ctc aaa ggc gaa gaa gtc tgc atc gac gga atc atc tat gac 261
Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr Asp
          35              40              45

ctc caa tca ttc gat cat ccc ggg ggt gaa acg atc aaa atg ttt ggt 309
Leu Gln Ser Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe Gly
          50              55              60              65

ggc aac gat gtc act gta cag tac aag atg att cac ccg tac cat acc 357
Gly Asn Asp Val Thr Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His Thr
          70              75              80

gag aag cat ttg gaa aag atg aag cgt gtc ggc aag gtg acg gat ttc 405
Glu Lys His Leu Glu Lys Met Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp Phe
          85              90              95

gtc tgc gag tac aag ttc gat acc gaa ttt gaa cgc gaa atc aaa cga 453

```


Val	Cys	Glu	Tyr	Lys	Phe	Asp	Thr	Glu	Phe	Glu	Arg	Glu	Ile	Lys	Arg		
		100					105					110					
gaa gtc ttc aag att gtg cga cga ggc aag gat ttc ggt act ttg gga 501																	
Glu	Val	Phe	Lys	Ile	Val	Arg	Arg	Gly	Lys	Asp	Phe	Gly	Thr	Leu	Gly		
		115				120					125						
tgg ttc ttc cgt gcg ttt tgc tac att gcc att ttc ttc tac ctg cag 549																	
Trp	Phe	Phe	Arg	Ala	Phe	Cys	Tyr	Ile	Ala	Ile	Phe	Phe	Tyr	Leu	Gln		
					135					140					145		
tac cat tgg gtc acc acg gga acc tct tgg ctg ctg gcc gtg gcc tac 597																	
Tyr	His	Trp	Val	Thr	Thr	Gly	Thr	Ser	Trp	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Tyr		
				150					155					160			
gga atc tcc caa gcg atg att ggc atg aat gtc cag cac gat gcc aac 645																	
Gly	Ile	Ser	Gln	Ala	Met	Ile	Gly	Met	Asn	Val	Gln	His	Asp	Ala	Asn		
			165					170					175				
cac ggg gcc acc tcc aag cgt ccc tgg gtc aac gac atg cta ggc ctc 693																	
His	Gly	Ala	Thr	Ser	Lys	Arg	Pro	Trp	Val	Asn	Asp	Met	Leu	Gly	Leu		
		180					185					190					
ggt gcg gat ttt att ggt ggt tcc aag tgg ctc tgg cag gaa caa cac 741																	
Gly	Ala	Asp	Phe	Ile	Gly	Gly	Ser	Lys	Trp	Leu	Trp	Gln	Glu	Gln	His		
		195				200					205						
tgg acc cac cac gct tac acc aat cac gcc gag atg gat ccc gat agc 789																	
Trp	Thr	His	His	Ala	Tyr	Thr	Asn	His	Ala	Glu	Met	Asp	Pro	Asp	Ser		
	210				215					220					225		
ttt ggt gcc gaa cca atg ctc cta ttc aac gac tat ccc ttg gat cat 837																	
Phe	Gly	Ala	Glu	Pro	Met	Leu	Leu	Phe	Asn	Asp	Tyr	Pro	Leu	Asp	His		
				230					235					240			
ccc gct cgt acc tgg cta cat cgc ttt caa gca ttc ttt tac atg ccc 885																	
Pro	Ala	Arg	Thr	Trp	Leu	His	Arg	Phe	Gln	Ala	Phe	Phe	Tyr	Met	Pro		
			245					250					255				
gtc ttg gct gga tac tgg ttg tcc gct gtc ttc aat cca caa att ctt 933																	
Val	Leu	Ala	Gly	Tyr	Trp	Leu	Ser	Ala	Val	Phe	Asn	Pro	Gln	Ile	Leu		
		260					265					270					
gac ctc cag caa cgc ggc gca ctt tcc gtc ggt atc cgt ctc gac aac 981																	
Asp	Leu	Gln	Gln	Arg	Gly	Ala	Leu	Ser	Val	Gly	Ile	Arg	Leu	Asp	Asn		
		275				280					285						
gct ttc att cac tcg cga cgc aag tat gcg gtt ttc tgg cgg gct gtg 1029																	
Ala	Phe	Ile	His	Ser	Arg	Arg	Lys	Tyr	Ala	Val	Phe	Trp	Arg	Ala	Val		
	290				295					300					305		
tac att gcg gtg aac gtg att gct ccg ttt tac aca aac tcc ggc ctc 1077																	
Tyr	Ile	Ala	Val	Asn	Val	Ile	Ala	Pro	Phe	Tyr	Thr	Asn	Ser	Gly	Leu		
			310						315					320			
gaa tgg tcc tgg cgt gtc ttt gga aac atc atg ctc atg ggt gtg gcg 1125																	
Glu	Trp	Ser	Trp	Arg	Val	Phe	Gly	Asn	Ile	Met	Leu	Met	Gly	Val	Ala		
			325					330					335				

gaa tcg ctc gcg ctg gcg gtc ctg ttt tcg ttg tcg cac aat ttc gaa 1173
 Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe Glu
 340 345 350

tcc gcg gat cgc gat ccg acc gcc cca ctg aaa aag acg gga gaa cca 1221
 Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu Pro
 355 360 365

gtc gac tgg ttc aag aca cag gtc gaa act tcc tgc act tac ggt gga 1269
 Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly Gly
 370 375 380 385

ttc ctt tcc ggt tgc ttc acg gga ggt ctc aac ttt cag gtt gaa cac 1317
 Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu His
 390 395 400

cac ttg ttc cca cgc atg agc agc gct tgg tat ccc tac att gcc ccc 1365
 His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala Pro
 405 410 415

aag gtc cgc gaa att tgc gcc aaa cac ggc gtc cac tac gcc tac tac 1413
 Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr Tyr
 420 425 430

ccg tgg atc cac caa aac ttt ctc tcc acc gtc cgc tac atg cac gcg 1461
 Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His Ala
 435 440 445

gcc ggg acc ggt gcc aac tgg cgc cag atg gcc aga gaa aat ccc ttg 1509
 Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro Leu
 450 455 460 465

acc gga cgg gcg taa aagtacacga caccgacaaa ggtggcggtat ggtgatctct 1564
 Thr Gly Arg Ala
 470

agaaaacaga catagcctac tggaaatata gacgtccaaa caataatttt aaagactatt 1624

tttctgcgta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1652

<210> 2

<211> 469

<212> PRT

<213> Phaeodactylum tricornutum

<400> 2

Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val
 1 5 10 15

Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser
 20 25 30

Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr
 35 40 45

Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe

50		55		60
Gly 65	Gly Asn Asp Val Thr Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His 80			
		70		75
Thr 65	Glu Lys His Leu Glu Lys Met Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp 95			
		85		90
Phe 65	Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys 110			
		100		105
Arg 65	Glu Val Phe Lys Ile Val Arg Arg Gly Lys Asp Phe Gly Thr Leu 125			
		115		120
Gly 65	Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu 140			
		130		135
Gln 65	Tyr His Trp Val Thr Thr Gly Thr Ser Trp Leu Leu Ala Val Ala 160			
		145		150
Tyr 65	Gly Ile Ser Gln Ala Met Ile Gly Met Asn Val Gln His Asp Ala 175			
		165		170
Asn 65	His Gly Ala Thr Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn Asp Met Leu Gly 190			
		180		185
Leu 65	Gly Ala Asp Phe Ile Gly Gly Ser Lys Trp Leu Trp Gln Glu Gln 205			
		195		200
His 65	Trp Thr His His Ala Tyr Thr Asn His Ala Glu Met Asp Pro Asp 220			
		210		215
Ser 65	Phe Gly Ala Glu Pro Met Leu Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Asp 240			
		225		230
His 65	Pro Ala Arg Thr Trp Leu His Arg Phe Gln Ala Phe Phe Tyr Met 255			
		245		250
Pro 65	Val Leu Ala Gly Tyr Trp Leu Ser Ala Val Phe Asn Pro Gln Ile 270			
		260		265
Leu 65	Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala Leu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asp 285			
		275		280
Asn 65	Ala Phe Ile His Ser Arg Arg Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala 300			
		290		295
Val 65	Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile Ala Pro Phe Tyr Thr Asn Ser Gly 320			
		305		310
Leu 65	Glu Trp Ser Trp Arg Val Phe Gly Asn Ile Met Leu Met Gly Val 335			
		325		330
Ala 65	Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe 350			
		340		345
Glu 65	Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu 365			
		355		360

Pro Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly
370 375 380

Gly Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu
385 390 395 400

His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala
405 410 415

Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr
420 425 430

Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His
435 440 445

Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro
450 455 460

Leu Thr Gly Arg Ala
465

<210> 3

<211> 1434

<212> DNA

<213> Phaeodactylum tricornutum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1434)

<400> 3

atg ggc aaa gga ggg gac gct cgg gcc tcg aag ggc tca acg gcg gct 48
Met Gly Lys Gly Gly Asp Ala Arg Ala Ser Lys Gly Ser Thr Ala Ala
1 5 10 15

cgc aag atc agt tgg cag gaa gtc aag acc cac gcg tct ccg gag gac 96
Arg Lys Ile Ser Trp Gln Glu Val Lys Thr His Ala Ser Pro Glu Asp
20 25 30

gcc tgg atc att cac tcc aat aag gtc tac gac gtg tcc aac tgg cac 144
Ala Trp Ile Ile His Ser Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Trp His
35 40 45

gaa cat ccc gga ggc gcc gtc att ttc acg cac gcc ggt gac gac atg 192
Glu His Pro Gly Gly Ala Val Ile Phe Thr His Ala Gly Asp Asp Met
50 55 60

acg gac att ttc gct gcc ttt cac gca ccc gga tcg cag tcg ctc atg 240
Thr Asp Ile Phe Ala Ala Phe His Ala Pro Gly Ser Gln Ser Leu Met
65 70 75 80

aag aag ttc tac att ggc gaa ttg ctc ccg gaa acc acc ggc aag gag 288
Lys Lys Phe Tyr Ile Gly Glu Leu Leu Pro Glu Thr Thr Gly Lys Glu
85 90 95

ccg cag caa atc gcc ttt gaa aag ggc tac cgc gat ctg cgc tcc aaa 336

Pro	Gln	Gln	Ile	Ala	Phe	Glu	Lys	Gly	Tyr	Arg	Asp	Leu	Arg	Ser	Lys		
			100					105					110				
ctc	atc	atg	atg	ggc	atg	ttc	aag	tcc	aac	aag	tgg	ttc	tac	gtc	tac	384	
Leu	Ile	Met	Met	Gly	Met	Phe	Lys	Ser	Asn	Lys	Trp	Phe	Tyr	Val	Tyr		
		115					120					125					
aag	tgc	ctc	agc	aac	atg	gcc	att	tgg	gcc	gcc	gcc	tgt	gct	ctc	gtc	432	
Lys	Cys	Leu	Ser	Asn	Met	Ala	Ile	Trp	Ala	Ala	Ala	Cys	Ala	Leu	Val		
	130					135					140						
ttt	tac	tcg	gac	cgc	ttc	tgg	gta	cac	ctg	gcc	agc	gcc	gtc	atg	ctg	480	
Phe	Tyr	Ser	Asp	Arg	Phe	Trp	Val	His	Leu	Ala	Ser	Ala	Val	Met	Leu		
145					150					155					160		
gga	aca	ttc	ttt	cag	cag	tcg	gga	tgg	ttg	gca	cac	gac	ttt	ctg	cac	528	
Gly	Thr	Phe	Phe	Gln	Gln	Ser	Gly	Trp	Leu	Ala	His	Asp	Phe	Leu	His		
				165					170					175			
cac	cag	gtc	ttc	acc	aag	cgc	aag	cac	ggg	gat	ctc	gga	gga	ctc	ttt	576	
His	Gln	Val	Phe	Thr	Lys	Arg	Lys	His	Gly	Asp	Leu	Gly	Gly	Leu	Phe		
			180					185					190				
tgg	ggg	aac	ctc	atg	cag	ggt	tac	tcc	gta	cag	tgg	tgg	aaa	aac	aag	624	
Trp	Gly	Asn	Leu	Met	Gln	Gly	Tyr	Ser	Val	Gln	Trp	Trp	Lys	Asn	Lys		
		195				200						205					
cac	aac	gga	cac	cac	gcc	gtc	ccc	aac	ctc	cac	tgc	tcc	tcc	gca	gtc	672	
His	Asn	Gly	His	His	Ala	Val	Pro	Asn	Leu	His	Cys	Ser	Ser	Ala	Val		
	210				215						220						
gcg	caa	gat	ggg	gac	ccg	gac	atc	gat	acc	atg	ccc	ctt	ctc	gcc	tgg	720	
Ala	Gln	Asp	Gly	Asp	Pro	Asp	Ile	Asp	Thr	Met	Pro	Leu	Leu	Ala	Trp		
225					230				235					240			
tcc	gtc	cag	caa	gcc	cag	tct	tac	cgg	gaa	ctc	caa	gcc	gac	gga	aag	768	
Ser	Val	Gln	Gln	Ala	Gln	Ser	Tyr	Arg	Glu	Leu	Gln	Ala	Asp	Gly	Lys		
				245				250						255			
gat	tcg	ggt	ttg	gtc	aag	ttc	atg	atc	cgt	aac	caa	tcc	tac	ttt	tac	816	
Asp	Ser	Gly	Leu	Val	Lys	Phe	Met	Ile	Arg	Asn	Gln	Ser	Tyr	Phe	Tyr		
			260					265					270				
ttt	ccc	atc	ttg	ttg	ctc	gcc	cgc	ctg	tcg	tgg	ttg	aac	gag	tcc	ttc	864	
Phe	Pro	Ile	Leu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Leu	Asn	Glu	Ser	Phe		
		275					280					285					
aag	tgc	gcc	ttt	ggg	ctt	gga	gct	gcg	tcg	gag	aac	gct	gct	ctc	gaa	912	
Lys	Cys	Ala	Phe	Gly	Leu	Gly	Ala	Ala	Ser	Glu	Asn	Ala	Ala	Leu	Glu		
	290				295						300						
ctc	aag	gcc	aag	ggt	ctt	cag	tac	ccc	ctt	ttg	gaa	aag	gct	ggc	atc	960	
Leu	Lys	Ala	Lys	Gly	Leu	Gln	Tyr	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ala	Gly	Ile		
305					310				315					320			
ctg	ctg	cac	tac	gct	tgg	atg	ctt	aca	gtt	tcg	tcc	ggc	ttt	gga	cgc	1008	
Leu	Leu	His	Tyr	Ala	Trp	Met	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Phe	Gly	Arg		
				325				330						335			

ttc tcg ttc gcg tac acc gca ttt tac ttt cta acc gcg acc gcg toc 1056
Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu Thr Ala Thr Ala Ser
340 345 350

tgt	gga	ttc	ttg	ctc	.gcc	att	gtc	ttt	ggc	ctc	ggc	cac	aac	ggc	atg	1104
Cys	Gly	Phe	Leu	Leu	Ala	Ile	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	His	Asn	Gly	Met	
		355					360					365				

gcc acc tac aat gcc gac gcc cgt ccg gac ttc tgg aag ctc caa gtc 1152
Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe Trp Lys Leu Gln Val
370 375 380

acc acg act cgc aac gtc acg ggc gga cac ggt ttc ccc caa gcc ttt 1200
Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly Phe Pro Gln Ala Phe
385 390 395 400

gtc gac tgg ttc tgt ggt ggc ctc cag tac caa gtc gac cac cac tta 1248
Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln Val Asp His His Leu
405 410 415

ttc ccc agc ctg ccc cga cac aat ctg gcc aag aca cac gca ctg gtc 1296
Phe Pro Ser Leu Pro Arg His Asn Leu Ala Lys Thr His Ala Leu Val
420 425 430

gaa tgc ttc tgc aag gag tgg ggt gtc cag tac cac gaa gcc gac ctt 1344
Glu Ser Phe Cys Lys Glu Trp Gly Val Gln Tyr His Glu Ala Asp Leu
435 440 445

gtg gac ggg acc atg gaa gtc ttg cac cat ttg ggc agc gtg gcc ggc 1392
Val Asp Gly Thr Met Glu Val Leu His His Leu Gly Ser Val Ala Gly
450 455 460

gaa ttc gtc gtg gat ttt gta cgc gat gga ccc gcc atg taa 1434
Glu Phe Val Val Asp Phe Val Arg Asp Gly Pro Ala Met
465 470 475

 $\langle 210 \rangle$ 4

<211> 477

<212> PRT

<213> Phaeodactylum tricornutum

<400> 4

Met Gly Lys Gly Gly Asp Ala Arg Ala Ser Lys Gly Ser Thr Ala Ala
1 5 10 15

Arg Lys. Ile Ser Trp Gln Glu Val Lys Thr His Ala Ser Pro Glu Asp
20 25 30

Ala Trp Ile Ile His Ser Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Trp His
35 40 45

Glu His Pro Gly Gly Ala Val Ile Phe Thr His Ala Gly Asp Asp Met
50 55 60

Thr Asp Ile Phe Ala Ala Phe His Ala Pro Gly Ser Gln Ser Leu Met
65 70 75 80

Lys Lys Phe Tyr Ile Gly Glu Leu Leu Pro Glu Thr Thr Gly Lys Glu
 85 90 95
 Pro Gln Gln Ile Ala Phe Glu Lys Gly Tyr Arg Asp Leu Arg Ser Lys
 100 105 110
 Leu Ile Met Met Gly Met Phe Lys Ser Asn Lys Trp Phe Tyr Val Tyr
 115 120 125
 Lys Cys Leu Ser Asn Met Ala Ile Trp Ala Ala Ala Cys Ala Leu Val
 130 135 140
 Phe Tyr Ser Asp Arg Phe Trp Val His Leu Ala Ser Ala Val Met Leu
 145 150 155 160
 Gly Thr Phe Phe Gln Gln Ser Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His
 165 170 175
 His Gln Val Phe Thr Lys Arg Lys His Gly Asp Leu Gly Gly Leu Phe
 180 185 190
 Trp Gly Asn Leu Met Gln Gly Tyr Ser Val Gln Trp Trp Lys Asn Lys
 195 200 205
 His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His Cys Ser Ser Ala Val
 210 215 220
 Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met Pro Leu Leu Ala Trp
 225 230 235 240
 Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu Gln Ala Asp Gly Lys
 245 250 255
 Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn Gln Ser Tyr Phe Tyr
 260 265 270
 Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Asn Glu Ser Phe
 275 280 285
 Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu Asn Ala Ala Leu Glu
 290 295 300
 Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu Glu Lys Ala Gly Ile
 305 310 315 320
 Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser Ser Gly Phe Gly Arg
 325 330 335
 Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu Thr Ala Thr Ala Ser
 340 345 350
 Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu Gly His Asn Gly Met
 355 360 365
 Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe Trp Lys Leu Gln Val
 370 375 380

Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly Phe Pro Gln Ala Phe
385 390 395 400

Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln Val Asp His His Leu
405 410 415

Phe Pro Ser Leu Pro Arg His Asn Leu Ala Lys Thr His Ala Leu Val
420 425 430

Glu Ser Phe Cys Lys Glu Trp Gly Val Gln Tyr His Glu Ala Asp Leu
435 440 445

Val Asp Gly Thr Met Glu Val Leu His His Leu Gly Ser Val Ala Gly
450 455 460

Glu Phe Val Val Asp Phe Val Arg Asp Gly Pro Ala Met
465 470 475

<210> 5

<211> 1651

<212> DNA

<213> Phaeodactylum tricornutum

<220>

<221> CDS

<222> (67)..(1554)

<400> 5

gaagaaggaa catataaaaag taagccatct cctcggcacc atctaaagac ctaatatcta 60

ctcgtc atg gtt cgc ttt tca aca gcc gct cta ctt tct ctg tcg aca 108
Met Val Arg Phe Ser Thr Ala Ala Leu Leu Ser Leu Ser Thr
1 5 10

ttg aca act tca tgt att ggt gcc ttc cag ctg tct tcg cca gca caa 156
Leu Thr Thr Ser Cys Ile Gly Ala Phe Gln Leu Ser Ser Pro Ala Gln
15 20 25 30

ctt ccg aca agt agg ctt cgt cgg cat acg aac acg gcg ccg ctt tcg 204
Leu Pro Thr Ser Arg Leu Arg Arg His Thr Asn Thr Ala Pro Leu Ser
35 40 45

gcc gtg gcc gtc gac tcc ggt tct tcc gat ccg gcc ttg gta ggc aac 252
Ala Val Ala Val Asp Ser Gly Ser Ser Asp Pro Ala Leu Val Gly Asn
50 55 60

ctc ccc ctt ccc aac aac aat gat aat gag gac aag aac cgt aga atg 300
Leu Pro Leu Pro Asn Asn Asn Asp Asn Glu Asp Lys Asn Arg Arg Met
65 70 75

cca atg atg gac ttg aaa ggt att gct ctg tct ggt ctc aaa ggg caa 348
Pro Met Met Asp Leu Lys Gly Ile Ala Leu Ser Gly Leu Lys Gly Gln
80 85 90

gct ctt tcc gtc cga gcg gaa gat ttt cct cag gcg aaa gac ttg cgt 396
Ala Leu Ser Val Arg Ala Glu Asp Phe Pro Gln Ala Lys Asp Leu Arg
95 100 105 110

gcc gtc att ccg aaa gat tgc ttc gaa ccc gac acg gcc aaa tcg ttg 444
 Ala Val Ile Pro Lys Asp Cys Phe Glu Pro Asp Thr Ala Lys Ser Leu
 115 120 125

gga tat ctt tcc gtt tca act atg ggg aca att ctc tgc tcc gtc gtc 492
 Gly Tyr Leu Ser Val Ser Thr Met Gly Thr Ile Leu Cys Ser Val Val
 130 135 140

ggc gcg aac ctc ctt agt gtg ctc gat ccc tcc aat cca tta acc tgg 540
 Gly Ala Asn Leu Leu Ser Val Leu Asp Pro Ser Asn Pro Leu Thr Trp
 145 150 155

cct ctc tgg gcg gcc tac ggt gcc gtc acg ggg acg gtc gcc atg ggg 588
 Pro Leu Trp Ala Ala Tyr Gly Ala Val Thr Gly Thr Val Ala Met Gly
 160 165 170

ctt tgg gtg ctg gcc cac gaa tgc gga cac ggc gcc ttt tcc aaa aac 636
 Leu Trp Val Leu Ala His Glu Cys Gly His Gly Ala Phe Ser Lys Asn
 175 180 185 190

cga tcc ctc cag gat gcc gtg ggg tac att atc cat tcc atc atg ctg 684
 Arg Ser Leu Gln Asp Ala Val Gly Tyr Ile Ile His Ser Ile Met Leu
 195 200 205

gtg cca tac ttt agt tgg cag cga tgc cat gcc gtg cat cac cag tat 732
 Val Pro Tyr Phe Ser Trp Gln Arg Ser His Ala Val His His Gln Tyr
 210 215 220

acc aat cat atg gaa ctg ggg gaa aca cac gtt cct gat cga gcc gat 780
 Thr Asn His Met Glu Leu Gly Glu Thr His Val Pro Asp Arg Ala Asp
 225 230 235

aag gag ggc gag aag agc ctg gcg ctc cgc cag ttc atg ttg gat tcc 828
 Lys Glu Gly Glu Lys Ser Leu Ala Leu Arg Gln Phe Met Leu Asp Ser
 240 245 250

ttt ggt aaa gac aag ggc atg aaa gca tac gga ggc ctc cag tgc ttt 876
 Phe Gly Lys Asp Lys Gly Met Lys Ala Tyr Gly Gly Leu Gln Ser Phe
 255 260 265 270

ttg cat ctc atc gtg gga tgg cca gcc tac ctc ctg atc ggt gcg acc 924
 Leu His Leu Ile Val Gly Trp Pro Ala Tyr Leu Leu Ile Gly Ala Thr
 275 280 285

ggt gga ccc gac cgt ggt atg acc aac cat ttt tat ccc aac cct ttg 972
 Gly Gly Pro Asp Arg Gly Met Thr Asn His Phe Tyr Pro Asn Pro Leu
 290 295 300

tgc acg cca aca cag ccc aag aaa gaa ctt ttc cct ggg aac tgg aaa 1020
 Ser Thr Pro Thr Gln Pro Lys Lys Glu Leu Phe Pro Gly Asn Trp Lys
 305 310 315

gaa aag gtc tac cag tca gat att gga atc gcc gcc gtt gtc ggc gcc 1068
 Glu Lys Val Tyr Gln Ser Asp Ile Gly Ile Ala Ala Val Val Gly Ala
 320 325 330

ctc att gct tgg acc gcc act tgc ggt cta gcc ccc gtc atg gcc ttg 1116

11

Leu Ile Ala Trp Thr Ala Thr Ser Gly Leu Ala Pro Val Met Ala Leu
 335 340 345 350

 tac ggt ggt ccc ttg atc gtc att aat gcc tgg ctg gta ctg tac acg 1164
 Tyr Gly Gly Pro Leu Ile Val Ile Asn Ala Trp Leu Val Leu Tyr Thr
 355 360 365

 tgg ttg caa cat aca gat acc gat gtt ccg cac ttt tcc tcc gac aac 1212
 Trp Leu Gln His Thr Asp Thr Asp Val Pro His Phe Ser Ser Asp Asn
 370 375 380

 cac aac ttt gtc aag ggc gca ctg cat acg atc gat cgt ccc tac gac 1260
 His Asn Phe Val Lys Gly Ala Leu His Thr Ile Asp Arg Pro Tyr Asp
 385 390 395

 aaa ctt gat ccc tgg gga atc ata gac ttt ctg cac cac aag att gga 1308
 Lys Leu Asp Pro Trp Gly Ile Ile Asp Phe Leu His His Lys Ile Gly
 400 405 410

 aca acg cat gtg gca cac cat ttt gac agt act atc ccc cac tat aag 1356
 Thr Thr His Val Ala His His Phe Asp Ser Thr Ile Pro His Tyr Lys
 415 420 425 430

 gct cag att gct acc gat gcc atc aaa gcc aag ttt cca gaa gtg tac 1404
 Ala Gln Ile Ala Thr Asp Ala Ile Lys Ala Lys Phe Pro Glu Val Tyr
 435 440 445

 ctc tat gac ccg aca cca att cca caa gcc atg tgg cgc gtc gcc aag 1452
 Leu Tyr Asp Pro Thr Pro Ile Pro Gln Ala Met Trp Arg Val Ala Lys
 450 455 460

 gga tgt act gca gta gag caa cgc ggt gac gcc tgg gtg tgg aaa aac 1500
 Gly Cys Thr Ala Val Glu Gln Arg Gly Asp Ala Trp Val Trp Lys Asn
 465 470 475

 gaa gga ata gaa gat ttg gtg gaa cat cgt caa agc aaa tta tcg agc 1548
 Glu Gly Ile Glu Asp Leu Val Glu His Arg Gln Ser Lys Leu Ser Ser
 480 485 490

 gaa taa agcaacatat cgctttatgg aagaacaaac gtccattgtg taaaaccctg 1604
 Glu
 495

 ataatttcaa tatttgtgtt tgtttttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1651

<210> 6

<211> 495

<212> PRT

<213> Phaeodactylum tricornutum

<400> 6

Met Val Arg Phe Ser Thr Ala Ala Leu Leu Ser Leu Ser Thr Leu Thr
 1 5 10 15

Thr Ser Cys Ile Gly Ala Phe Gln Leu Ser Ser Pro Ala Gln Leu Pro
 20 25 30

12

Thr Ser Arg Leu Arg Arg His Thr Asn Thr Ala Pro Leu Ser Ala Val
 35 40 45
 Ala Val Asp Ser Gly Ser Ser Asp Pro Ala Leu Val Gly Asn Leu Pro
 50 55 60
 Leu Pro Asn Asn Asn Asp Asn Glu Asp Lys Asn Arg Arg Met Pro Met
 65 70 75 80
 Met Asp Leu Lys Gly Ile Ala Leu Ser Gly Leu Lys Gly Gln Ala Leu
 85 90 95
 Ser Val Arg Ala Glu Asp Phe Pro Gln Ala Lys Asp Leu Arg Ala Val
 100 105 110
 Ile Pro Lys Asp Cys Phe Glu Pro Asp Thr Ala Lys Ser Leu Gly Tyr
 115 120 125
 Leu Ser Val Ser Thr Met Gly Thr Ile Leu Cys Ser Val Val Gly Ala
 130 135 140
 Asn Leu Leu Ser Val Leu Asp Pro Ser Asn Pro Leu Thr Trp Pro Leu
 145 150 155 160
 Trp Ala Ala Tyr Gly Ala Val Thr Gly Thr Val Ala Met Gly Leu Trp
 165 170 175
 Val Leu Ala His Glu Cys Gly His Gly Ala Phe Ser Lys Asn Arg Ser
 180 185 190
 Leu Gln Asp Ala Val Gly Tyr Ile Ile His Ser Ile Met Leu Val Pro
 195 200 205
 Tyr Phe Ser Trp Gln Arg Ser His Ala Val His His Gln Tyr Thr Asn
 210 215 220
 His Met Glu Leu Gly Glu Thr His Val Pro Asp Arg Ala Asp Lys Glu
 225 230 235 240
 Gly Glu Lys Ser Leu Ala Leu Arg Gln Phe Met Leu Asp Ser Phe Gly
 245 250 255
 Lys Asp Lys Gly Met Lys Ala Tyr Gly Gly Leu Gln Ser Phe Leu His
 260 265 270
 Leu Ile Val Gly Trp Pro Ala Tyr Leu Leu Ile Gly Ala Thr Gly Gly
 275 280 285
 Pro Asp Arg Gly Met Thr Asn His Phe Tyr Pro Asn Pro Leu Ser Thr
 290 295 300
 Pro Thr Gln Pro Lys Lys Glu Leu Phe Pro Gly Asn Trp Lys Glu Lys
 305 310 315 320
 Val Tyr Gln Ser Asp Ile Gly Ile Ala Ala Val Val Gly Ala Leu Ile
 325 330 335
 Ala Trp Thr Ala Thr Ser Gly Leu Ala Pro Val Met Ala Leu Tyr Gly

[illegible]

```
<210> 7
<211> 1578
<212> DNA
<213> Physcomitrella patens
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1578)
```

<400> 7																48
atg	gta	ttc	gcg	ggc	ggt	gga	ctt	cag	cag	ggc	tct	ctc	gaa	gaa	aac	
Met	Val	Phe	Ala	Gly	Gly	Gly	Leu	Gln	Gln	Gly	Ser	Leu	Glu	Glu	Asn	
1				5					10					15		
atc	gac	gtc	gag	cac	att	gcc	agt	atg	tct	ctc	ttc	agc	gac	ttc	ttc	96
Ile	Asp	Val	Glu	His	Ile	Ala	Ser	Met	Ser	Leu	Phe	Ser	Asp	Phe	Phe	
			20					25					30			
agt	tat	gtg	tct	tca	act	gtt	ggt	tcg	tgg	agc	gta	cac	agt	ata	caa	144
Ser	Tyr	Val	Ser	Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Trp	Ser	Val	His	Ser	Ile	Gln	
		35					40					45				
cct	ttg	aag	cgc	ctg	acg	agt	aag	aag	cgt	gtt	tcg	gaa	agc	gct	gcc	192
Pro	Leu	Lys	Arg	Leu	Thr	Ser	Lys	Lys	Arg	Val	Ser	Glu	Ser	Ala	Ala	
	50					55					60					
gtg	caa	tgt	ata	tca	gct	gaa	gtt	cag	aga	aat	tcg	agt	acc	cag	gga	240
Val	Gln	Cys	Ile	Ser	Ala	Glu	Val	Gln	Arg	Asn	Ser	Ser	Thr	Gln	Gly	

65	70	75	80
act gcg gag gca ctc gca gaa tca gtc gtg aag ccc acg aga cga agg			288
Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg			
	85	90	95
tca tct cag tgg aag aag tcg aca cac ccc cta tca gaa gta gca gta			336
Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val			
	100	105	110
cac aac aag cca agc gat tgc tgg att gtt gta aaa aac aag gtg tat			384
His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr			
	115	120	125
gat gtt tcc aat ttt gcg gac gag cat ccc gga gga tca gtt att agt			432
Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser			
	130	135	140
act tat ttt gga cga gac ggc aca gat gtt ttc tct agt ttt cat gca			480
Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala			
	145	150	155
gct tct aca tgg aaa att ctt caa gac ttt tac att ggt gac gtg gag			528
Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu			
	165	170	175
agg gtg gag ccg act cca gag ctg ctg aaa gat ttc cga gaa atg aga			576
Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg			
	180	185	190
gct ctt ttc ctg agg gag caa ctt ttc aaa agt tcg aaa ttg tac tat			624
Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr			
	195	200	205
gtt atg aag ctg ctc acg aat gtt gct att ttt gct gcg agc att gca			672
Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala			
	210	215	220
ata ata tgt tgg agc aag act att tca gcg gtt ttg gct tca gct tgt			720
Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys			
	225	230	235
atg atg gct ctg tgt ttc caa cag tgc gga tgg cta tcc cat gat ttt			768
Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe			
	245	250	255
ctc cac aat cag gtg ttt gag aca cgc tgg ctt aat gaa gtt gtc ggg			816
Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly			
	260	265	270
tat gtg atc ggc aac gcc gtt ctg ggg ttt agt aca ggg tgg tgg aag			864
Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys			
	275	280	285
gag aag cat aac ctt cat cat gct gct cca aat gaa tgc gat cag act			912
Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr			
	290	295	300

15

tac caa cca att gat gaa gat att gat act ctc ccc ctc att gcc tgg	960
Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp	
305 310 315 320	
agc aag gac ata ctg gcc aca gtt gag aat aag aca ttc ttg cga atc	1008
Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile	
325 330 335	
ctc caa tac cag cat ctg ttc ttc atg ggt ctg tta ttt ttc gcc cgt	1056
Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg	
340 345 350	
ggg agt tgg ctc ttt tgg agc tgg aga tat acc tct aca gca gtg ctc	1104
Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu	
355 360 365	
tca cct gtc gac agg ttg ttg gag aag gga act gtt ctg ttt cac tac	1152
Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr	
370 375 380	
ttt tgg ttc gtc ggg aca gcg tgc tat ctt ctc cct ggt tgg aag cca	1200
Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro	
385 390 395 400	
tta gta tgg atg gcg gtg act gag ctc atg tcc ggc atg ctg ctg ggc	1248
Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly	
405 410 415	
ttt gta ttt gta ctt agc cac aat ggg atg gag gtt tat aat tgc tct	1296
Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser	
420 425 430	
aaa gaa ttc gtg agt gca cag atc gta tcc aca cgg gat atc aaa gga	1344
Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly	
435 440 445	
aac ata ttc aac gac tgg ttc act ggt ggc ctt aac agg caa ata gag	1392
Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu	
450 455 460	
cat cat ctt ttc cca aca atg ccc agg cat aat tta aac aaa ata gca	1440
His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala	
465 470 475 480	
cct aga gtg gag gtg ttc tgt aag aaa cac ggt ctg gtg tac gaa gac	1488
Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp	
485 490 495	
gta tct att gct acc ggc act tgc aag gtt ttg aaa gca ttg aag gaa	1536
Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu	
500 505 510	
gtc gcg gag gct gcg gca gag cag cat gct acc acc agt taa	1578
Val Ala Glu Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser	
515 520 525	

<211> 525

<212> PRT

<213> Physcomitrella patens

<400> 8

Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn
 1 5 10 15

Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe
 20 25 30

Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln
 35 40 45

Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala
 50 55 60

Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly
 65 70 75 80

Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg
 85 90 95

Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val
 100 105 110

His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr
 115 120 125

Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser
 130 135 140

Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala
 145 150 155 160

Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu
 165 170 175

Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg
 180 185 190

Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr
 195 200 205

Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala
 210 215 220

Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys
 225 230 235 240

Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe
 245 250 255

Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly
 260 265 270

Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys
 275 280 285

17

Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr
 290 295 300
 Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp
 305 310 315 320
 Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile
 325 330 335
 Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg
 340 345 350
 Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu
 355 360 365
 Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr
 370 375 380
 Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro
 385 390 395 400
 Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly
 405 410 415
 Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser
 420 425 430
 Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly
 435 440 445
 Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu
 450 455 460
 His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala
 465 470 475 480
 Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp
 485 490 495
 Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu
 500 505 510
 Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser
 515 520 525

<210> 9

<211> 873

<212> DNA

<213> Physcomitrella patens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(873)

<400> 9

atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag ttg gat ggg aag gtc tcg 48

18

Met	Glu	Val	Val	Glu	Arg	Phe	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Gly	Lys	Val	Ser		
1				5					10					15			
cag	ggc	gtg	aat	gca	ttg	ctg	ggc	agt	ttt	ggg	gtg	gag	ttg	acg	gat	96	
Gln	Gly	Val	Asn	Ala	Leu	Leu	Gly	Ser	Phe	Gly	Val	Glu	Leu	Thr	Asp		
			20				25						30				
acg	ccc	act	acc	aaa	ggc	ttg	ccc	ctc	gtt	gac	agt	ccc	aca	ccc	atc	144	
Thr	Pro	Thr	Thr	Lys	Gly	Leu	Pro	Leu	Val	Asp	Ser	Pro	Thr	Pro	Ile		
		35					40					45					
gtc	ctc	ggc	gtt	tct	gta	tac	ttg	act	att	gtc	att	gga	ggg	ctt	ttg	192	
Val	Leu	Gly	Val	Ser	Val	Tyr	Leu	Thr	Ile	Val	Ile	Gly	Gly	Leu	Leu		
	50					55						60					
tgg	ata	aag	gcc	agg	gat	ctg	aaa	ccg	cgc	gcc	tcg	gag	cca	ttt	ttg	240	
Trp	Ile	Lys	Ala	Arg	Asp	Leu	Lys	Pro	Arg	Ala	Ser	Glu	Pro	Phe	Leu		
65				70						75					80		
ctc	caa	gct	ttg	gtg	ctt	gtg	cac	aac	ctg	ttc	tgt	ttt	gcg	ctc	agt	288	
Leu	Gln	Ala	Leu	Val	Leu	Val	His	Asn	Leu	Phe	Cys	Phe	Ala	Leu	Ser		
				85				90						95			
ctg	tat	atg	tgc	gtg	ggc	atc	gct	tat	cag	gct	att	acc	tgg	cgg	tac	336	
Leu	Tyr	Met	Cys	Val	Gly	Ile	Ala	Tyr	Gln	Ala	Ile	Thr	Trp	Arg	Tyr		
			100					105					110				
tct	ctc	tgg	ggc	aat	gca	tac	aat	cct	aaa	cat	aaa	gag	atg	gcg	att	384	
Ser	Leu	Trp	Gly	Asn	Ala	Tyr	Asn	Pro	Lys	His	Lys	Glu	Met	Ala	Ile		
		115					120					125					
ctg	gta	tac	ttg	ttc	tac	atg	tct	aag	tac	gtg	gaa	ttc	atg	gat	acc	432	
Leu	Val	Tyr	Leu	Phe	Tyr	Met	Ser	Lys	Tyr	Val	Glu	Phe	Met	Asp	Thr		
	130					135					140						
gtt	atc	atg	ata	ctg	aag	cgc	agc	acc	agg	caa	ata	agc	ttc	ctc	cac	480	
Val	Ile	Met	Ile	Leu	Lys	Arg	Ser	Thr	Arg	Gln	Ile	Ser	Phe	Leu	His		
145					150					155					160		
gtt	tat	cat	cat	tct	tca	att	tcc	ctc	att	tgg	tgg	gct	att	gct	cat	528	
Val	Tyr	His	His	Ser	Ser	Ile	Ser	Leu	Ile	Trp	Trp	Ala	Ile	Ala	His		
				165					170					175			
cac	gct	cct	ggc	ggc	gaa	gca	tat	tgg	tct	gcg	gct	ctg	aac	tca	gga	576	
His	Ala	Pro	Gly	Gly	Glu	Ala	Tyr	Trp	Ser	Ala	Ala	Leu	Asn	Ser	Gly		
			180					185					190				
gtg	cat	gtt	ctc	atg	tat	gcg	tat	tac	ttc	ttg	gct	gcc	tgc	ctt	cga	624	
Val	His	Val	Leu	Met	Tyr	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Ala	Ala	Cys	Leu	Arg		
		195				200						205					
agt	agc	cca	aag	tta	aaa	aat	aag	tac	ctt	ttt	tgg	ggc	agg	tac	ttg	672	
Ser	Ser	Pro	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Tyr	Leu	Phe	Trp	Gly	Arg	Tyr	Leu		
		210				215					220						
aca	caa	ttc	caa	atg	ttc	cag	ttt	atg	ctg	aac	tta	gtg	cag	gct	tac	720	
Thr	Gln	Phe	Gln	Met	Phe	Gln	Phe	Met	Leu	Asn	Leu	Val	Gln	Ala	Tyr		
225					230					235					240		

tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca caa tgg ctg atc aag att 768
 Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile
 245 250 255

ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt ctt ttc ggc aat ttt tac 816
 Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr
 260 265 270

gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga aag caa aag gga gct aaa 864
 Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys
 275 280 285

act gag tga 873
 Thr Glu
 290

<210> 10

<211> 290

<212> PRT

<213> Physcomitrella patens

<400> 10

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser
 1 5 10 15

Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp
 20 25 30

Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile
 35 40 45

Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu
 50 55 60

Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu
 65 70 75 80

Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser
 85 90 95

Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr
 100 105 110

Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile
 115 120 125

Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr
 130 135 140

Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His
 145 150 155 160

Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His
 165 170 175

His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly

	180		185		190
Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg					
	195		200		205
Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu					
	210		215		220
Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr					
	225		230		235
Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile					
		245		250	255
Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr					
		260		265	270
Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys					
	275		280		285
Thr Glu					
	290				

<210> 11
 <211> 1526
 <212> DNA
 <213> Phaeodactylum tricornutum

<220>
 <221> CDS
 <222> (92)..(1402)

<400> 11
 gcttccgtta gcgtcccata gtttggttaca cttggctgtg aaacgaatac gttcttggtc 60
 tacttactac aacgaagcaa ccaccagcag c atg ggt aag gga ggt caa cga 112
 Met Gly Lys Gly Gly Gln Arg
 1 5
 gct gta gct ccc aag agt gcc acc agc tct act ggc agt gct acc ctt 160
 Ala Val Ala Pro Lys Ser Ala Thr Ser Ser Thr Gly Ser Ala Thr Leu
 10 15 20
 agc caa agc aag gaa cag gta tgg act tcg tcg tac aac cct ctg gcg 208
 Ser Gln Ser Lys Glu Gln Val Trp Thr Ser Ser Tyr Asn Pro Leu Ala
 25 30 35
 aag gat tcc ccg gag ctg cca acc aaa ggc caa atc aag gcc gtc att 256
 Lys Asp Ser Pro Glu Leu Pro Thr Lys Gly Gln Ile Lys Ala Val Ile
 40 45 50 55
 ccg aag gaa tgt ttc caa cgc tca gcc ttt tgg tct acc ttc tac ctg 304
 Pro Lys Glu Cys Phe Gln Arg Ser Ala Phe Trp Ser Thr Phe Tyr Leu
 60 65 70
 atg cgc gat ctc gcc atg gct gcc gcc ttt tgc tac gga acc tca cag 352
 Met Arg Asp Leu Ala Met Ala Ala Ala Phe Cys Tyr Gly Thr Ser Gln

75						80						85						
gtc	ctc	tcc	acc	gac	ctt	ccc	caa	gac	gcc	acg	ctc	att	ctg	ccc	tgg	400		
Val	Leu	Ser	Thr	Asp	Leu	Pro	Gln	Asp	Ala	Thr	Leu	Ile	Leu	Pro	Trp			
		90					95					100						
gct	ctc	ggc	tgg	ggc	gtc	tac	gcc	ttt	tgg	atg	gga	acc	att	ctc	acc	448		
Ala	Leu	Gly	Trp	Gly	Val	Tyr	Ala	Phe	Trp	Met	Gly	Thr	Ile	Leu	Thr			
	105					110					115							
ggg	cct	tgg	gta	gtt	gcg	cac	gaa	tgt	gga	cac	ggc	gct	tac	tcc	gac	496		
Gly	Pro	Trp	Val	Val	Ala	His	Glu	Cys	Gly	His	Gly	Ala	Tyr	Ser	Asp			
120					125					130					135			
tcc	cag	acg	ttc	aat	gac	gtg	gtc	ggc	ttt	atc	gtc	cac	caa	gct	ttg	544		
Ser	Gln	Thr	Phe	Asn	Asp	Val	Val	Gly	Phe	Ile	Val	His	Gln	Ala	Leu			
				140					145					150				
ctc	gtc	ccc	tac	ttt	gcc	tgg	cag	tac	acc	cac	gcg	aaa	cac	cac	cgt	592		
Leu	Val	Pro	Tyr	Phe	Ala	Trp	Gln	Tyr	Thr	His	Ala	Lys	His	His	Arg			
			155					160					165					
cga	acc	aac	cat	ctg	gtg	gac	ggc	gag	tcc	cac	gtc	cct	tct	acc	gcc	640		
Arg	Thr	Asn	His	Leu	Val	Asp	Gly	Glu	Ser	His	Val	Pro	Ser	Thr	Ala			
		170					175					180						
aag	gat	aac	ggc	ctc	ggg	ccg	cac	aac	gag	cga	aac	tcc	ttc	tac	gcc	688		
Lys	Asp	Asn	Gly	Leu	Gly	Pro	His	Asn	Glu	Arg	Asn	Ser	Phe	Tyr	Ala			
	185					190					195							
gcg	tgg	cac	gag	gcc	atg	gga	gac	ggc	gcc	ttt	gcc	gtc	ttt	caa	gtc	736		
Ala	Trp	His	Glu	Ala	Met	Gly	Asp	Gly	Ala	Phe	Ala	Val	Phe	Gln	Val			
200					205					210				215				
tgg	tcg	cac	ttg	ttc	gtc	ggc	tgg	cct	ctc	tac	ttg	gcc	ggt	ctg	gcc	784		
Trp	Ser	His	Leu	Phe	Val	Gly	Trp	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Leu	Ala			
				220					225					230				
agt	acc	gga	aag	ctt	gcg	cac	gaa	ggt	tgg	tgg	ctg	gaa	gaa	cgg	aac	832		
Ser	Thr	Gly	Lys	Leu	Ala	His	Glu	Gly	Trp	Trp	Leu	Glu	Glu	Arg	Asn			
			235					240					245					
gcg	att	gcg	gat	cac	ttt	cga	ccc	agc	tct	ccc	atg	ttc	ccc	gcc	aag	880		
Ala	Ile	Ala	Asp	His	Phe	Arg	Pro	Ser	Ser	Pro	Met	Phe	Pro	Ala	Lys			
		250					255					260						
atc	cgt	gcc	aag	att	gcc	ctt	tcc	agc	gcg	acg	gaa	ctc	gcc	gtg	ctc	928		
Ile	Arg	Ala	Lys	Ile	Ala	Leu	Ser	Ser	Ala	Thr	Glu	Leu	Ala	Val	Leu			
	265					270					275							
gct	gga	ctc	ttg	tat	gtc	ggt	aca	cag	gtc	gga	cac	ctt	ccc	gtc	ctg	976		
Ala	Gly	Leu	Leu	Tyr	Val	Gly	Thr	Gln	Val	Gly	His	Leu	Pro	Val	Leu			
280					285					290				295				
ctg	tgg	tac	tgg	gga	ccg	tac	acc	ttt	gtc	aac	gct	tgg	ctt	gta	ctc	1024		
Leu	Trp	Tyr	Trp	Gly	Pro	Tyr	Thr	Phe	Val	Asn	Ala	Trp	Leu	Val	Leu			
				300					305					310				

tac acg tgg ctg cag cat acg gac ccg tcc atc ccg cac tac ggt gaa 1072
 Tyr Thr Trp Leu Gln His Thr Asp Pro Ser Ile Pro His Tyr Gly Glu
 315 320 325

ggc gag tgg acc tgg gtc aag ggc gcg ctc tct acc att gat cga gac 1120
 Gly Glu Trp Thr Trp Val Lys Gly Ala Leu Ser Thr Ile Asp Arg Asp
 330 335 340

tac ggc atc ttc gat ttc ttt cac cac acc atc ggt tcc acg cac gtg 1168
 Tyr Gly Ile Phe Asp Phe Phe His His Thr Ile Gly Ser Thr His Val
 345 350 355

gta cac cat ttg ttc cac gaa atg ccc tgg tac aat gcc ggc att gcc 1216
 Val His His Leu Phe His Glu Met Pro Trp Tyr Asn Ala Gly Ile Ala
 360 365 370 375

acg caa aag gtc aag gaa ttt ttg gaa ccc cag ggc ttg tac aat tac 1264
 Thr Gln Lys Val Lys Glu Phe Leu Glu Pro Gln Gly Leu Tyr Asn Tyr
 380 385 390

gat ccg acc ccc tgg tac aag gcc atg tgg cgc att gcc cgg acc tgt 1312
 Asp Pro Thr Pro Trp Tyr Lys Ala Met Trp Arg Ile Ala Arg Thr Cys
 395 400 405

cac tat gtg gag tca aac gag ggt gtg cag tat ttc aag agt atg gaa 1360
 His Tyr Val Glu Ser Asn Glu Gly Val Gln Tyr Phe Lys Ser Met Glu
 410 415 420

aac gtg ccg ctg act aag gat gtg cga aac aaa gcc gca tga 1402
 Asn Val Pro Leu Thr Lys Asp Val Arg Asn Lys Ala Ala
 425 430 435

gaaaaagtgc caccgacgca taattttaca atcctaccaa caagaccaac attatatggt 1462

tttcgcttaa aagatagttt tttctaccat ctgtgtagtc ggcacaaaaa aaaaaaaaaa 1522

aaaa 1526

<210> 12

<211> 436

<212> PRT

<213> Phaeodactylum tricornutum

<400> 12

Met Gly Lys Gly Gly Gln Arg Ala Val Ala Pro Lys Ser Ala Thr Ser
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Ser Ala Thr Leu Ser Gln Ser Lys Glu Gln Val Trp Thr
 20 25 30

Ser Ser Tyr Asn Pro Leu Ala Lys Asp Ser Pro Glu Leu Pro Thr Lys
 35 40 45

Gly Gln Ile Lys Ala Val Ile Pro Lys Glu Cys Phe Gln Arg Ser Ala
 50 55 60

Phe Trp Ser Thr Phe Tyr Leu Met Arg Asp Leu Ala Met Ala Ala Ala

23

65	70	75	80
Phe Cys Tyr Gly Thr Ser Gln Val Leu Ser Thr Asp Leu Pro Gln Asp	85	90	95
Ala Thr Leu Ile Leu Pro Trp Ala Leu Gly Trp Gly Val Tyr Ala Phe	100	105	110
Trp Met Gly Thr Ile Leu Thr Gly Pro Trp Val Val Ala His Glu Cys	115	120	125
Gly His Gly Ala Tyr Ser Asp Ser Gln Thr Phe Asn Asp Val Val Gly	130	135	140
Phe Ile Val His Gln Ala Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ala Trp Gln Tyr	145	150	155
Thr His Ala Lys His His Arg Arg Thr Asn His Leu Val Asp Gly Glu	165	170	175
Ser His Val Pro Ser Thr Ala Lys Asp Asn Gly Leu Gly Pro His Asn	180	185	190
Glu Arg Asn Ser Phe Tyr Ala Ala Trp His Glu Ala Met Gly Asp Gly	195	200	205
Ala Phe Ala Val Phe Gln Val Trp Ser His Leu Phe Val Gly Trp Pro	210	215	220
Leu Tyr Leu Ala Gly Leu Ala Ser Thr Gly Lys Leu Ala His Glu Gly	225	230	235
Trp Trp Leu Glu Glu Arg Asn Ala Ile Ala Asp His Phe Arg Pro Ser	245	250	255
Ser Pro Met Phe Pro Ala Lys Ile Arg Ala Lys Ile Ala Leu Ser Ser	260	265	270
Ala Thr Glu Leu Ala Val Leu Ala Gly Leu Leu Tyr Val Gly Thr Gln	275	280	285
Val Gly His Leu Pro Val Leu Leu Trp Tyr Trp Gly Pro Tyr Thr Phe	290	295	300
Val Asn Ala Trp Leu Val Leu Tyr Thr Trp Leu Gln His Thr Asp Pro	305	310	315
Ser Ile Pro His Tyr Gly Glu Gly Glu Trp Thr Trp Val Lys Gly Ala	325	330	335
Leu Ser Thr Ile Asp Arg Asp Tyr Gly Ile Phe Asp Phe Phe His His	340	345	350
Thr Ile Gly Ser Thr His Val Val His His Leu Phe His Glu Met Pro	355	360	365
Trp Tyr Asn Ala Gly Ile Ala Thr Gln Lys Val Lys Glu Phe Leu Glu	370	375	380

Pro Gln Gly Leu Tyr Asn Tyr Asp Pro Thr Pro Trp Tyr Lys Ala Met
 385 390 395 400

Trp Arg Ile Ala Arg Thr Cys His Tyr Val Glu Ser Asn Glu Gly Val
 405 410 415

Gln Tyr Phe Lys Ser Met Glu Asn Val Pro Leu Thr Lys Asp Val Arg
 420 425 430

Asn Lys Ala Ala
 435

<210> 13

<211> 3598

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Sequenz stellt eine pflanzliche
 Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor
 pUC19 dar

<400> 13

tcgcgcgctt cggtgatgac ggtgaaaacc totgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
 accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcagggcgcc 240
 attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcggggc tcttcgctat 300
 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360
 tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cggcgcgccg agctcctcga 420
 gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttgttttt gttttactat 480
 gtgtgttatg tatttgattt gcgataaatt tttatatttg gtactaaatt tataacacct 540
 tttatgctaa cgtttgccaa cacttagcaa ttgcaagtt gattaattga ttctaaatta 600
 tttttgtctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaatatctc 660
 tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttggaga ttttaattgtt 720
 gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780
 taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaaggtttag taatttttca 840
 agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgcc tgtggaaagt 900
 ttaaaaatat tttggaaatg atttgcatgg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt 960
 ggaggatgca ataatgaaga aaactacaaa tttacatgca actagttatg catgtagtct 1020

atataatgag gatttttgcaa tacttttcatt catacacact cactaagttt tacacgatta 1080
taattttcttc atagccagcc caccgcggtg ggcggccgcc tgcagtctag aaggcctcct 1140
gctttaatga gatatgcgag acgcctatga tcgcatgata tttgctttca attctgttgt 1200
gcacgttgta aaaaacctga gcatgtgtag ctcagatcct taccgccggt ttcggttcatt 1260
tctaataaat atatcaccgg ttactatcgt atttttatga ataataattct ccgttcaatt 1320
tactgattgt ccgtcgacga attcgagctc ggcgcgccaa gcttggcgta atcatggtca 1380
tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc cacacaacat acgagccgga 1440
agcataaagt gtaaagcctg gggtgccata tgagtgcgt aactcacatt aattgcgttg 1500
cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc 1560
caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac 1620
tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtaata 1680
cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa 1740
aaggccagga accgtaaaaa ggcgcggttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct 1800
gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgcac aggactataa 1860
agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctcgctgcgt ctctgttcc gacctgccg 1920
cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca 1980
cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa 2040
cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaaccg 2100
gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg 2160
tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg 2220
acagtatttg gtatctgcgc tctgtgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc 2280
tcttgatccg gcaaacaac caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag 2340
attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac 2400
gctcagtggg acgaaaactc acgttaaggg attttggta tgagattatc aaaaaggatc 2460
ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag 2520
taaacttggt ctgacagtta ccaatgctta atcagtgcgg cactatctc agcgatctgt 2580
ctatttcgtt catccatagt tgctgactc ccgctcgtgt agataactac gatacgggag 2640
ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccagctc accggctcca 2700
gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact 2760

ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca 2820
 gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg 2880
 tttggtatgg cttcattcag ctccgggtcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc 2940
 atgttgtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg 3000
 gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcca 3060
 tccgtaagat gcttttctgt gactgggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt 3120
 atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc 3180
 agaactttta aagtgtcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc 3240
 ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg caccactg atcttcagca 3300
 tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa 3360
 aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttctttt tcaatattat 3420
 tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggatata tatttgaatg tatttagaaa 3480
 aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt cccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa 3540
 accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtc 3598

<210> 14

<211> 3590

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Sequenz stellt eine pflanzliche
 Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor
 pUC19 dar

<400> 14

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
 accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
 attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcggggc tcttcgctat 300
 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360
 tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cggcgcgccg agtcctcga 420
 gcaaatttac acattgccac taaacgtota aacccttgta atttgttttt gttttactat 480
 gtgtgttatg tatttgattt gcgataaatt tttatatttg gtactaaatt tataacacct 540

tttatgctaa cgtttgccaa cacttagcaa tttgcaagtt gattaattga ttctaaatta 600
tttttgtctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaatatttc 660
tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttggaga ttttaattggt 720
gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780
taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaagggttag taatttttca 840
agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgcc tgtggaaagt 900
ttaaaaaatat tttggaaatg atttgcattg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt 960
ggaggatgca ataataaga aaactacaaa tttacatgca actagttatg catgtagtct 1020
atataatgag gattttgcaa tactttcatt catacacact cactaagttt tacacgatta 1080
taatttcttc atagccagcg gatccgatat cgggcccgt agcgttaacc ctgctttaat 1140
gagatatgcg agacgcctat gatcgcatga tatttgcttt caattctgtt gtgcacgttg 1200
taaaaaacct gagcatgtgt agctcagatc cttaccgccc gtttcgggtt attctaataga 1260
atatatcacc cgttactatc gtatttttat gaataataat ctccgttcaa tttactgatt 1320
gtccgtcgac gaattcgagc tcggcgcgcc aagcttggcg taatcatggt catagctgtt 1380
tcctgtgtga aattgttatc cgctcacaat tccacacaa atacgagccg gaagcataaa 1440
gtgtaaagcc tgggggtgct aatgagtgag ctaactcaca ttaattgctg tgcgctcact 1500
gcccgttttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc 1560
ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg 1620
ctcggctcgtt cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc 1680
cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag 1740
gaaccgtaaa aaggccgctg tgcgtggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca 1800
tcacaaaaat cgacgtcaa gtcagagggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca 1860
ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgctg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg 1920
atacctgtcc gcctttctcc cttcggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag 1980
gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt 2040
tcagcccagc cgctgcgct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca 2100
cgacttatcg cactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg 2160
cgggtctaca gagttcttga agtgggtggc taactaeggc tacactagaa ggacagtatt 2220
tggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc 2280

cggcaaacaa accaccgctg gtagcgggtg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg 2340
 cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg 2400
 gaacgaaaac tcacgttaag ggatttttgg catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta 2460
 gatccttttta aattaaat gaagtttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg 2520
 gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcacgcatct gtctatttctg 2580
 ttcattccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggccttacc 2640
 atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttatac 2700
 agcaataaac cagccagccg gaagggccga ggcagaaagt ggtcctgcaa ctttatccgc 2760
 ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag 2820
 tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttgggtat 2880
 ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg 2940
 caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc gatcgttgctc agaagtaagt tggccgcagt 3000
 gttatcactc atgggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag 3060
 atgcttttct gtgactgggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg 3120
 accgagttgc tcttgcccg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt 3180
 aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct 3240
 gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg tgcaccaac tgatcttcag catcttttac 3300
 tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggat 3360
 aagggcgaca cggaaatgtt gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat 3420
 ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca 3480
 aataggggtt ccgcgcacat tccccgaaa agtgccacct gacgtctaag aaaccattat 3540
 tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg ccttttcgtc 3590

<210> 15
 <211> 3584
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220>
 <223> Sequenz stellt eine pflanzliche
 Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor
 pUC19 dar

<400> 15
 tcgcgcgttt cgggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60

cagcttgtct gtaageggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
attcgccatt caggctgcmc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggccc tcttcgctat 300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgaagg ccagtgaatt cggcgcgccg agctcctcga 420
gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttgttttt gttttactat 480
gtgtgttatg tatttgattt gcgataaatt tttatatattg gtactaaatt tataacacct 540
tttatgctaa cgtttgcaa cacttagcaa tttgcaagtt gattaattga ttctaaatta 600
tttttgtctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaatatctc 660
tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttggaga ttaattgtt 720
gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780
taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaaggtttag taatttttca 840
agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgcc tgtggaaagt 900
ttaaaaatat tttggaaatg atttgcatgg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt 960
ggaggatgca ataataaga aaactacaaa tttacatgca actagttatg catgtagtct 1020
atataatgag gattttgcaa tactttcatt catacacact cactaagttt tacacgatta 1080
taattttctt atagccagca gatctgccg catcgatccc gggccatggc ctgctttaat 1140
gagatatgcg agacgcctat gatcgcatga tatttgcttt caattctgtt gtgcacgttg 1200
taaaaaacct gagcatgtgt agctcagatc cttaccgcg gtttcggttc attctaata 1260
atatatcacc cgttactatc gtatttttat gaataatatt ctccgttcaa tttactgatt 1320
gtccgtcgac gagctcggcg cgcoaagctt ggcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt 1380
gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa 1440
agcctggggg gcctaataag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc 1500
tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcgggggag 1560
aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt 1620
cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 1680
atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 1740
taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcaca 1800

aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accagggcgtt 1860
tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 1920
gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 1980
cagttcgggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 2040
cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccgggtaa gacacgactt 2100
atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg tagggcgtgc 2160
tacagagttc ttgaagtggc ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat 2220
ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 2280
acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 2340
aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga 2400
aaactcacgt taagggattt tggcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 2460
tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat cttaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga 2520
cagttaccaaa tgcttaataca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttogttcatc 2580
catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 2640
ccccagtgc gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 2700
aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat 2760
ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 2820
caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 2880
attcagctcc gggtcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 2940
agcgggttagc tccttcgggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 3000
actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 3060
ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 3120
ttgctcttgc ccggcgtaaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 3180
gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 3240
atccagttcg atgtaaccca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 3300
cagcgtttct gggtagcga aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 3360
gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca 3420
gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 3480
ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 3540

gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gagggcccttt cgtc

3584

<210> 16

<211> 4507

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Sequenz stellt eine pflanzliche
Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor
pUC19 dar

<400> 16

tgcgcgcttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aaggcgatc ggtgcgggccc tcttcgctat 300
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cggcgcgccg agtcctcga 420
gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttgttttt gttttactat 480
gtgtgttatg tatttgattt gcgataaatt tttatatattg gtactaaatt tataacacct 540
tttatgctaa cgtttgccaa cacttagcaa ttgcaagtt gattaattga ttctaaatta 600
tttttgtctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaatatctc 660
tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttggaga ttaattgtt 720
gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780
taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaagggttag taatttttca 840
agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgccc tgtggaaagt 900
ttaaaaatat ttggaatg atttgcatgg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt 960
ggaggatgca ataataaga aaactacaaa ttacatgca actagttatg catgtagtct 1020
atataatgag gattttgcaa tactttcatt catacacact cactaagttt tacacgatta 1080
taattttctt atagccagcc caccgcgggtg ggccggccgc tgcagtctag aaggcctcct 1140
gctttaatga gatatgcgag accgctatga tcgcatgata tttgctttca attctgttgt 1200
gcacgttgta aaaaacctga gcatgtgtag ctcatcctt taccgccggt ttcggttcat 1260
tctaatgaat atatcacccg ttactatcgt atttttatga ataataattct ccgttcaatt 1320

tactgattgt cgcgcgagca aatttacaca ttgccactaa acgtctaaac ccttgtaatt 1380
tgtttttggt ttactatgtg tgttatgtat ttgatttgcg ataaattttt atatttggtta 1440
ctaaatttat aacacctttt atgctaacgt ttgccaacac ttagcaattt gcaagttgat 1500
taattgattc taaattattt ttgtcttcta aatacatata ctaatcaact ggaaatgtaa 1560
atatttgcta atattttctac tataggagaa tttaaagtgag tgaatatggg accacaagggt 1620
ttggagattt aattgttgca atgctgcatg gatggcatat acaccaaaca ttcaataatt 1680
cttgaggata ataatggtac cacacaagat ttgagggtgca tgaacgtcac gtggacaaaa 1740
ggtttagtaa tttttcaaga caacaatgtt accacacaca agttttgagg tgcattgcatg 1800
gatgccctgt ggaaagttaa aaaatatttt ggaaatgatt tgcattggaag ccatgtgtaa 1860
aaccatgaca tccacttgga ggatgcaata atgaagaaaa ctacaaattt acatgcaact 1920
agttatgcat gtagtctata taatgaggat tttgcaatac tttcattcat acacactcac 1980
taagttttac acgattataa tttcttcata gccagcggat ccgatatcgg gcccgctagc 2040
gttaaccctg ctttaatgag atatgcgaga cgcctatgat cgcattgatat ttgctttcaa 2100
ttctgtgtg caggttgtaa aaaacctgag catgtgtagc tcagatcctt accgcgggtt 2160
tcggttcatt ctaatgaata tatcaccogt tactatcgta tttttatgaa taatattctc 2220
cgttcaattt actgattgtc cgcgcgagca ttcgagctcg gcgcgcgaag cttggcgtaa 2280
tcattggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata 2340
cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gattgagcta actcacatta 2400
attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgcgtgcca gctgcattaa 2460
tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg 2520
ctcactgact cgctgcgctc ggtcggttcg ctgcggcgag cggatatcag tcaactcaaag 2580
gcggtataac ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa 2640
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc 2700
cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca 2760
ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg 2820
accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct 2880
catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggctg ttcgctcaa gctgggctgt 2940
gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggttaacta tcgtcttgag 3000
tccaaccogg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag cactggtaa caggattagc 3060

agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac 3120
actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga 3180
gttggttagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtgggtt ttttggttgc 3240
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg 3300
gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gagattatca 3360
aaaaggatct tcacctagat ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt 3420
atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca 3480
gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg 3540
atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca 3600
ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggg 3660
cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattggt gccgggaagc tagagtaagt 3720
agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgtca 3780
cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca 3840
tgatcccca tggttgtaa aaaagcgggt agctccttcg gtccctccgat cgttgtcaga 3900
agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact 3960
gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga 4020
gaatagtgtg tgogggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg 4080
ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc 4140
tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga 4200
tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat 4260
gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt 4320
caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga goggatacat atttgaatgt 4380
atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac 4440
gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat cagcaggccc 4500
tttcgtc 4507

<210> 17
<211> 5410
<212> DNA
<213> Unknown

<220>

<223> Sequenz stellt eine pflanzliche
Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor
pUC19 dar

<400> 17

```
ttttggaaat gatttgcacg gaagccatgt gtaaaacacat gacatccact tggaggatgc 60
aataatgaag aaaactacaa atttacatgc aactagttat gcatgtagtc tatataatga 120
ggattttgca atactttcat tcatacacac tactaagtt ttacacgatt ataattttctt 180
catagccagc ggatccgata tcggggccgc tagcgttaac cctgctttaa tgagatatgc 240
gagacgccta tgatcgcatg atatttgctt tcaattctgt tgtgcacggt gtaaaaaacc 300
tgagcatgtg tagctcagat ccttaccgcc ggtttcgggt cattctaatt aatataatcac 360
ccgttactat cgtattttta tgaataatat tctccgttca atttactgat tgtccgtcga 420
gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttggtttt gttttactat 480
gtgtgttatg tatttgattt gcgataaatt tttatatatt gtactaaatt tataaacact 540
tttatgctaa cgtttgccaa cacttagcaa tttgcaagtt gattaattga ttctaaatta 600
tttttgcctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatatt ctaatatctc 660
tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttggaga ttaattgtt 720
gcaatgctgc atggatggca tataaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780
taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaagggttag taatttttca 840
agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgcc tgtggaaagt 900
ttaaaaatat tttggaaatg atttgcacgg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt 960
ggaggatgca ataataaga aaactacaaa ttacatgca actagttatg catgtagtct 1020
atataatgag gattttgcaa tactttcatt cacacacact cactaagttt tacacgatta 1080
taattttctt atagccagca gatctgcgg catcgatccc gggccatggc ctgctttaat 1140
gagatatgag agacgcctat gatcgcatga tatttgcttt caattctgtt gtgcacggtg 1200
taaaaaacct gagcatgtgt agctcagatc cttaccgccg gtttcgggtt attctaattga 1260
atatatcacc cgttactatc gtatttttat gaataatatt ctccgttcaa ttactgatt 1320
gtccgtcgac gagctcggcg cgccaagctt ggcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt 1380
gtgaaattgt tatccgtcga caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa 1440
agcctggggg gcctaataag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc 1500
tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcgccaac gcggggggag 1560
aggcgggttg cgtattgggc gctcttcgc ttctcgtc actgactcgc tgcgctcgg 1620
```

cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 1680
atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 1740
taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia 1800
aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt 1860
tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 1920
gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 1980
cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 2040
cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccgggtaa gacacgactt 2100
atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc 2160
tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat 2220
ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 2280
acaaaccacc gctggtagcg gtgggttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 2340
aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacg 2400
aaactcacgt taagggatth tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 2460
tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat ctaaaagtata tatgagtaaa cttggtctga 2520
cagttaccaa tgcttaatac gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac 2580
catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 2640
ccccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 2700
aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat 2760
ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 2820
caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 2880
attcagctcc gggtcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 2940
agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 3000
actcatgggt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 3060
ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtagtc ggcgaccgag 3120
ttgtctttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 3180
gctcatcatt ggaaaacgtt ctccggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 3240
atccagttcg atgtaaccca ctctgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 3300
cagcgtttct gggtagagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 3360

gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca 3420
gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 3480
ggttccgcgc acattttccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 3540
gacattaacc tataaaaaata ggcgatatcac gagggcccttt cgtctcgcgc gtttcgggtga 3600
tgacgggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc 3660
ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg 3720
ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcgggtgtga 3780
aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgccattcgc cattcaggct 3840
gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgcg ggccctcttcg ctattacgcc agctggcgaa 3900
agggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcc gggttttccc agtcacgacg 3960
ttgtaaaacg acggccagtg aattcggcgc gccgagctcc tcgagcaaatt ttacacattg 4020
ccactaaacg tctaaaccct tgtaatttgt ttttgtttta ctatgtgtgt tatgtatttg 4080
at ttgcgata aattttttata tttggtacta aatttataac accttttatg ctaacgtttg 4140
ccaacactta gcaatttgca agttgattaa ttgattctaa attatttttg tcttctaaat 4200
acatatacta atcaactgga aatgtaaata tttgctaata tttctactat aggagaatta 4260
aagtgagtga atatgggtacc acaaggtttg gagatttaatt tgttgcaatg ctgcatggat 4320
ggcatataca ccaaacattc aataattctt gaggataata atggtaccac acaagatttg 4380
aggtgcatga acgtcacgtg gacaaaagggt ttagtaattt ttcaagacaa caatgttacc 4440
acacacaagt tttgaggtgc atgcatggat gccctgtgga aagtttataaa atattttgga 4500
aatgatttgc atggaagcca tgtgtaaaac catgacatcc acttgaggga tgcaataatg 4560
aagaaaacta caaatttaca tgcaactagt tatgcatgta gtctatataa tgaggatttt 4620
gcaatacttt cattcataca cactcactaa gttttacacg attataattt cttcatagcc 4680
agcccaccgc ggtgggcggc cgccctgcagt ctagaaggcc tcctgcttta atgagatatg 4740
cgagacgcct atgatcgcat gatatttgct ttcaattctg ttgtgcacgt tgtaaaaaac 4800
ctgagcatgt gtagctcaga tccttaccgc cggtttcgggt tcattctaatt gaatatatca 4860
cccgttacta tcgtattttt atgaataata ttctccgttc aatttactga ttgtccgtcg 4920
agcaaattta cacattgcca ctaaacgtct aaacccttgt aatttgtttt tgttttacta 4980
tgtgtgttat gtatttgatt tgcgataaat ttttatattt ggtactaaat ttataacacc 5040
ttttatgcta acgtttgcca acacttagca atttgcaagt tgattaattg attctaaatt 5100

atttttgtct tctaaatata tataactaatc aactggaaat gtaaataattt gctaataattt 5160
 ctactatagg agaatttaaag tgagtgaata tgggtaccaca aggttttgag atttaattgt 5220
 tgcaatgctg catggatggc atatacacca aacattcaat aattcttgag gataataatg 5280
 gtaccacaca agatttgagg tgcatagaacg tcacgtggac aaaagggttta gtaatttttc 5340
 aagacaacaa tgttaccaca cacaagtttt gaggtgcatg catggatgcc ctgtggaaag 5400
 tttaaaaata 5410

<210> 18

<211> 648

<212> DNA

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(648)

<220>

<223> .

<400> 18

tggtggaaaacaaagcacaaaggacacacgccgtcccccacctccac	48
Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His	
1 5 10 15	
tgtctctccgcatgtcgcgcaagatggggacccggacatcgataccatg	96
Cys Ser Ser Ala Val Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met	
20 25 30	
ccccttctcgcctggtctgtcagcaagccagctttacctcgggaaatc	144
Pro Leu Leu Ala Trp Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu	
35 40 45	
caagccgacggaaaggatctgggtttgtcaagttcatgatcgcgtaac	192
Gln Ala Asp Gly Lys Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn	
50 55 60	
caatctttttttatctttcccattcttggtctcgcccgctgtctgttg	240
Gln Ser Tyr Phe Tyr Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp	
65 70 75 80	
ttgaacgagtctttcaagtgcgcctttgggcttggaactgcgtcgag	288
Leu Asn Glu Ser Phe Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu	
85 90 95	
aagctgctctcgaaatcaggccaaagggtcttcagctacccccttttg	336
Asn Ala Ala Leu Glu Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu	
100 105 110	
gaaaggtggtatctgctgcacactgttggtatgcttacaattctg	384
Glu Lys Ala Gly Ile Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser	
115 120 125	

tcc ggc ttt gga cgc ttc tcg ttc gcg tac acc gca ttt tac ttt cta 432
 Ser Gly Phe Gly Arg Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu
 130 135 140

acc gcg acc gcg tcc tgt gga ttc ttg ctc gcc att gtc ttt ggc ctc 480
 Thr Ala Thr Ala Ser Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu
 145 150 155 160

ggc cac aac ggc atg gcc acc tac aat gcc gac gcc cgt ccg gac ttc 528
 Gly His Asn Gly Met Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe
 165 170 175

tgg aag ctc caa gtc acc acg act cgc aac gtc acg ggc gga cac ggt 576
 Trp Lys Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly
 180 185 190

ttc ccc caa gcc ttt gtc gac tgg ttc tgt ggt ggc ctc cag tac caa 624
 Phe Pro Gln Ala Phe Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln
 195 200 205

gtc gac cac cac tta ttc ccc agc 648
 Val Asp His His Leu Phe Pro Ser
 210 215

<210> 19
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> *Phaeodactylum tricornutum*

<400> 19
 Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His
 1 5 10 15

Cys Ser Ser Ala Val Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met
 20 25 30

Pro Leu Leu Ala Trp Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu
 35 40 45

Gln Ala Asp Gly Lys Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn
 50 55 60

Gln Ser Tyr Phe Tyr Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp
 65 70 75 80

Leu Asn Glu Ser Phe Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu
 85 90 95

Asn Ala Ala Leu Glu Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu
 100 105 110

Glu Lys Ala Gly Ile Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser
 115 120 125

Ser Gly Phe Gly Arg Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu
 130 135 140

Thr Ala Thr Ala Ser Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu
145 150 155 160

Gly His Asn Gly Met Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe
165 170 175

Trp Lys Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly
180 185 190

Phe Pro Gln Ala Phe Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln
195 200 205

Val Asp His His Leu Phe Pro Ser
210 215

<210> 20

<211> 12093

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> pflanzlicher Expressionsvektor mit einer
Promotor-Terminator-Expressionskassette

<400> 20

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgcc 120
tagtgggagg tgacgtcggt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccg cagcaccggc 180
ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360
tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420
gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacgggt ggggggttcag cagccggcgc 480
tttactggca cttcaggaac aagcggggcg tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
cggagaatca taogcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660
ccggcacgcg accggggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720
gcgaggcggg tttttcggcc ggggacgccc tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780
ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcggcggca 840
ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tcggggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900
ccggtccgga cgcagcgctc gagcaggggac tcgcggtgat tgcgatgga ttggcgaaaa 960

ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020
tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080
ccaccgcgtc agacgcccgt agcagcccgc tacgggcttt ttcattgccct gccctagcgt 1140
ccaagcctca cggcgcgcgt cggectctct ggcgcccttc tggcgctctt ccgcttcctc 1200
gtcactgac tcgtgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa 1260
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 1380
ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac 1440
aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaaagctc ctctgcgct ctctgttcc 1500
gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ttttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccctctttt 1620
tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttctgtaga ctctccttgg tgtatccaac 1680
ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tccttcttca 1740
ctgtccctta ttgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg 1800
ctaccgccgg cgtaacagat gagggaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860
agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
agggggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggtaca 1980
aatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcatc aatggcgacc 2040
tgggcccctt gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccgcgc acggcgcggt 2100
tcggtgatgc cagatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160
gcaaggtcat gatgggcgtg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
aacggccggg gggtgcgctg gattgccaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280
gacttcgcgg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
gacgctcacc gggctggttg cctcgcgcg tgggctggcg gcggtctatg gccctgcaaa 2400
cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc gttgtggata 2460
cctcgcggaa aacttgccc tcaactgacag atgaggggag gacgttgaca cttgaggggc 2520
cgactacccc ggcgcgcgct tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
gatgtggaca agcctgggga taagtgcct gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700

tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaaggggtt 2820
ccgcccgttt ttccggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatattat 2880
aaaccttggt tttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
tgccccccct tctcgaacct tcccggcccc ctaacgcggg cctcccatcc cccagggggc 3000
tgcgcccttc ggccgcgaac ggctcacc caaaaatggc agcgctggca gtccttgcca 3060
ttgccgggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
ttgacgtgcc gcaggtgctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
gcggcctggg tggcggcctg cccttcaact cggccgtcgg ggcattcacg gacttcatgg 3240
cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcgggt gccgtgctcg 3300
tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgagggt ataggtaaga ttataccgag 3360
gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420
ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540
ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaaact 3600
tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660
attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720
tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccagg 3780
gctgcctcag attcagggtta tgccgctcaa ttccgtcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840
gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca ggggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900
cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960
atacgtgcmc aacaaccgtc ttccggagac tgcatacgc gtaaaacagc cagcgctggc 4020
gcgatttagc cccgacatag cccactggt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080
tgcccggctg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140
cgtgttgagg ccaacgcca taatgcgggc tgttgccgg catccaacgc cattcatggc 4200
catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260
ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt cggcggtgc ttttgccgtt 4320
acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataattg 4440

tggtttcaaa atcgggtccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500
aaaagctgtt ttctgggtatt taagggttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560
cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
taaattggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680
gtaaaagata cggaagggaat gtctcctgct aagggtatata agctgggtggg agaaaatgaa 4740
aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800
gaaaaggaca tgatgctatg gctggaaggga aagctgcctg ttccaaagggt cctgcacttt 4860
gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920
gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
aggctctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg attttttaaa gacggaaaag 5160
cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280
gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg ggaagaaca gtatgtcgag 5340
ctatTTTTTtg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatTTTta 5400
ctggatgaat tgTTTTtagta cctagatgtg ggcgaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
caccgacttc ttccgcatca agtgTTTTtg ctctcaggcc gagggccacg gcaagtattt 5520
gggcaagggg tcgtgggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
ggcaccaggc ggggtcaaatac aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700
cccgcaagga ggggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
cgacgcgggg ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820
gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatgggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880
gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgccccgc ccatcggccg ccgtggagcg 5940
ttcgcgtcgt ctogaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060
cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
ttccttgttc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgccaa acgacacggc 6180

ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccc cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240
ggtcattttc caggtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctcg agctgcgggc 6300
cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360
cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg 6420
ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtgcgcgcta caggcgacgg cgatgggctt 6480
cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtcg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540
ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600
gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac 6660
ggcccgcagg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgcg tcaagctgga 6720
aaccttccgc ctcatgtgcg gatcggatcc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctgggt gaacacgcct gggccaatga 6840
tgacctgggt cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900
agccagcgtt ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960
tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc 7080
cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag 7140
cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgttc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200
ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcgggtc tcaaacagga ggacggcccc 7260
aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaac gcgaggccga 7320
ggggtcgcgc gtatgctgct gcgggcgttg ccggcggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380
cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcattctca tcctcggcgc acttaatat 7440
tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggcgg ggtcgcggcg 7500
acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcattc ctgcgcgtct gctaggtagc 7560
ccgatacgat tgatggcggc cctgggggct atttgcgga ctgcgggcgt ggcgctgttg 7620
gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtccgcgtcg cagcgggcct ggcgggggcg 7680
gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgctc 7740
acctttaccg cctggcaact ggcgcccgga ggacttctgc tcgttccagt agctttagt 7800
tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tgggtccggg ggatctcgcg actogaacct 7920

acagttgttt ccttactggg ctttctcagc cccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980
catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcgggtg agcaatggat 8040
aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttcctcag 8100
cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160
cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgagag ggagatgata 8220
tttcatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgagaga 8280
tcatccgtgt ttcaaaccgg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccggga ctgatgggct 8400
gcctgtatcg agtgggtgatt ttgtgccgag ctgccggctg gggagctgtt ggctggctgg 8460
tggcaggata tattgtgggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgag 8520
gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
tgcccttcac cgcctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
gcaggcgaaa atcctgtttg atgggtgggtc cgaaatcgcc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
agaatagccc gagatagggg tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa 8760
gaacgtggac tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820
tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtccgaggtgc cgtaaagcac taaatcgga 8880
ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940
ggaagggaag aaagcgaaa gagcgggccc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
gatcgggtgag ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060
gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120
aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataatt attgataaaa taacaagtca 9180
ggatattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240
tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcatatta 9300
tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360
agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420
tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag ccatttcgcc gccaagctct 9480
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac 9660

agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgata gacaagaccg 9720
gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtgggc gaatgggcag 9780
gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900
tcccttcccc cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960
agccacgata gccgcgctgc ctgctcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcgggc 10020
ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080
ccgattgtct gttgtgcccc gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260
agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgacctagg cgacttttga 10320
acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380
tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc 10440
gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gtcatagata ttgatccct 10500
gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560
cttaccagag ggcccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620
gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcggt 10680
ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
actggctttc tacgtgttcc gcttccttta gcagcccttg cgccctgagt gcttgccgca 10800
gcgtgaagct tgcatgcctg caggtcgacg gcgcgcgag ctccctcgagc aaatttacac 10860
attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920
tttgatttgc gataaatttt tatatttggc actaaattta taacaccttt tatgctaacg 10980
tttgccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt cttaaattatt tttgtcttct 11040
aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga 11100
attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160
ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220
tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt 11280
taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatattt 11340
tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400

aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cacgattata atttcttcat 11520
 agccagccca ccgcggtggg cggccgcctg cagtctagaa ggcctcctgc tttaatgaga 11580
 tatgcgagac gcctatgac gcacgatatt tgctttcaat tctgttggtgc acgttgtaaa 11640
 aaacctgagc atgtgtagct cagatcctta ccgccgggtt cggttcattc taatgaatat 11700
 atcaccggtt actatcgtat ttttatgaat aatattctcc gttcaattta ctgattgtcc 11760
 gtcgacgaat tcgagctcgg cgcgcctcta gaggatcgat gaattcagat cggctgagtg 11820
 gctccttcaa cgttgcggtt ctgtcagttc caaacgtaaa acggcttggtc ccgcgtcatc 11880
 ggccgggggtc ataacgtgac tcccttaatt ctccgctcat gatcagattg tcgtttcccg 11940
 ccttcagttt aaactatcag tgtttgacag gatataattgg cgggtaaacc taagagaaaa 12000
 gagcgtttat tagaataatc ggatatttaa aagggcgtga aaagggttat ccttcgtcca 12060
 tttgtatgtg catgccaacc acagggttcc cca 12093

<210> 21

<211> 12085

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> pflanzlicher Expressionsvektor mit einer
Promotor-Terminator-Expressionskassette

<400> 21

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
 gcgcccagca cagggtgcga ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgcca 120
 tagtgggagg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccg cagcaccggc 180
 ataatacagg cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
 ttcttttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360
 tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420
 gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacggtt gggggttcag cagccggcgc 480
 tttactggca cttcaggaac aagcgggcgc tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
 cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
 ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660

ccggcacgcg accggggcgca ccgcagatgg aaacgggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720
gcgaggcggg tttttcggcc ggggacgccg tcaatgcgt gatgacaatc agctacttca 780
ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcggcgga 840
ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgtgt tgccggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900
ccggtccgga cgcagcgttc gagcaggac tcgcggtgat tgcgatgga ttggcgaaaa 960
ggaggctcgt tgcaggaac gttgaaggac cgagaaagg tgacgattga tcaggaccgc 1020
tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080
ccaccgcgtc agacgcccgt agcagccgc tacgggcttt ttcattgccct gccctagcgt 1140
ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggccggccttc tggcgctctt ccgcttcctc 1200
gctcactgac tcgctgcgt cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa 1260
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 1380
ccgccccct gacgagcatc aaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgcac 1440
aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctctgctgct ctctgttcc 1500
gacctgccc cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
ccgctgcata acctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccattctttt 1620
tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttcttgg tgtatccaac 1680
ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccaccgcg gagcgggtgt tccttcttca 1740
ctgtccctta ttgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgca ggctggccgg 1800
ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860
agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
aggcggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggctaca 1980
aatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcatc aatggcgacc 2040
tgggccgcct gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccgcgc acggcgcggt 2100
tcggtgatgc cacgatctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160
gcaaggcat gatggcgctg gtccgccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
aacggccggg ggggtgcgct gattgccaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280
gacttcgagg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
gacgctcacc gggctggttg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400

cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc gttgtggata 2460
cctcgcgga aacttggccc tcaactgacag atgagggggcg gacgttgaca cttgagggggc 2520
cgactcaccg ggcgcgggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
gatgtggaca agcctgggga taagtgccct gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700
tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgagggggcag agtgctgaca gatgagggggc 2760
gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaaggggtt 2820
ccgcccgttt ttcgggcacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880
aaaccttggt tttaaccagg gctgcgccct gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
tgccccccct tctcgaacc tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc cccagggggc 3000
tgcgccccct ggccgcgaac ggccacacc caaaaatggc agcgctggca gtccttgcca 3060
ttgcccggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
ttgacgtgcc gcagggtgctg gcacgcacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcatgg 3240
cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcggtt gccgtgctcg 3300
tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgagggtg ataggtaaga ttataccgag 3360
gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420
ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540
ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600
tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660
attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720
tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccagg 3780
gctgcctcag attcagggtta tgccgctcaa ttgcgtcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840
gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900
cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gccccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960
atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaaacagc cagcgtggc 4020
gcgatttagc cccgacatag cccactggt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080
tgccccgctg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140

cgtgttgagg ccaacgccc taatgcgggc tgttgcccgg catccaacgc cattcatggc 4200
catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260
ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtgc ttttgccgtt 4320
acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataattg 4440
tggttttcaa atcgggtccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500
aaaagctggt ttctgggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560
cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
taaattggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680
gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggatatata agctgggtggg agaaaatgaa 4740
aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800
gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggc cctgcacttt 4860
gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920
gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
aggctctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg attttttaa gacggaaaag 5160
cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280
gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggaagaaca gtatgtcgag 5340
ctatTTTTTg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatttta 5400
ctggatgaat tgttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
caccgacttc ttccgcatca agtgTTTTTg ctctcaggcc gagggccacg gcaagtattt 5520
gggcaagggg tcgctggat tcgtgcagg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
ggcaccaggc ggggtcaaac aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700
cccgcaagga ggggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
cgacgcgggg ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820
gccccgcgaa accttcagtc ccgtcggctc gatgggtccag caagctacgg ccaagatoga 5880

gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcgggccg ccgtggagcg 5940
ttcgcgtcgt ctgcaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacagggtcag 6060
cgaggccaag caggcccgct tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
ttccttggtc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgccaa acgacacggc 6180
ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240
ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctc agctgcgggc 6300
cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360
cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg 6420
ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480
cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgctg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540
ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600
gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgctgccgac 6660
ggcccgcagg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga 6720
aaccttccgc ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgctg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct ggggtcaatga 6840
tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtgggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900
agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960
tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggccttgag cggccgacgt gcaggatttc 7080
cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tggttcgggtc cgtttacgag 7140
cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgctc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200
ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctc tcaaacagga ggacggcccc 7260
aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga 7320
ggggtcgccg gtatgctgct gcgggcgctt cgggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380
cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcattctca tcctcggcgc acttaatat 7440
tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccggggcg ggtcgcggcg 7500
acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggte gtgttcattc ctgccgctct gctaggtagc 7560
ccgatacgat tgatggcggt cctgggggct atttgcgga ctgcgggcgt ggcgctgttg 7620

gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctcg cagcgggcct ggcgggggcg 7680
gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgctc 7740
acctttaccg cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagtg 7800
tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct 7920
acagttgttt ccttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980
catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcgggtg agcaatggat 8040
aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttcctcag 8100
cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagtcc tcaagatcga cagcctgtca 8160
cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata 8220
tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
tcacccgtgt ttcaaaccgc gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccggg ctgatgggct 8400
gcctgtatcg agtgggtgatt ttgtgccgag ctgccggctc gggagctggt ggctggctgg 8460
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520
gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
tgcccttcac cgcttgccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
gcaggcgaaa atcctgtttg atggtggttc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
agaatagccc gagatagggg tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa 8760
gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820
tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa 8880
ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940
ggaagggaag aaagcgaaag gagcggggcg cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
gatcggtgcg ggctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060
gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120
aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataatt attgataaaa taacaagtca 9180
ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240
tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300
tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360

agcttggggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420
tcgggagcg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagctct 9480
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaaac 9660
agttcgggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgac gacaagaccg 9720
gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttgggtggc gaatgggcag 9780
gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900
tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaaagcc cgtcgtggcc 9960
agccacgata gccgcgctgc ctgctcctgc agttcattca gggcacccga caggtcggtc 10020
ttgacaaaaa gaaccggggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080
ccgattgtct gttgtgcca gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260
agtggagcat ttttgacaag aaatatgtgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320
acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380
tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc 10440
gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgac ttgatcccct 10500
gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560
cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620
gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgctt 10680
ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
actggctttc tacgtgttcc gcttccttta gcagcccttg cgccctgagt gcttgcgga 10800
gcgtgaagct tgcatgcctg caggctgacg gcgcgccgag ctctcgagc aaatttacac 10860
attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920
tttgatttgc gataaatttt tataatttgg actaaattta taacacctt tatgctaacg 10980
tttgccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt cttaaattatt tttgtcttct 11040
aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga 11100

attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160
 ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220
 tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt 11280
 taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccttg tggaaagttt aaaaatatatt 11340
 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400
 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cagcattata atttcttcat 11520
 agccagcggg tccgatatcg ggcccgttag cgttaaccct gctttaatga gatatgcgag 11580
 acgcctatga tcgcatgata tttgctttca attctgttgt gcacgttgta aaaaacctga 11640
 gcatgtgtag ctcagatcct taccgccggt ttcggttcat tctaataat atatcaccgg 11700
 ttactatcgt atttttatga ataataattct ccgttcaatt tactgattgt ccgtcgacga 11760
 attcgagctc ggcgcgccctc tagaggatcg atgaattcag atcggctgag tggctccttc 11820
 aacgttgctg ttctgtcagt tccaaacgta aaacggcttg tcccgcgtca tcggcggggg 11880
 tcataacgtg actcccttaa ttctccgctc atgatcagat tgtcgtttcc cgccttcagt 11940
 ttaaactatc agtgtttgac aggatatatt ggcgggtaaa cctaagagaa aagagcgttt 12000
 attagaataa tcggatatatt aaaagggcgt gaaaaggttt atccttcgtc catttgtatg 12060
 tgcatgccaa ccacagggtt ccca 12085

<210> 22

<211> 12079

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> pflanzlicher Expressionsvektor mit einer
Promotor-Terminator-Expressionskassette

<400> 22

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
 gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgcc 120
 tagtgggctg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccg cagcaccggc 180
 ataatacaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360
 tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420

gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacggtt ggggggttcag cagccggcgc 480
tttactggca cttcaggaac aagcggggcg tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
ggaatgcccc cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660
ccggcacgcg accggggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720
gcgaggcggg tttttcggcc ggggacgccg tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780
ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg ggcacagcga tgccggcgag cgcggcgga 840
ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tcggggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900
ccggtccgga cgcagcgttc gagcaggac tcgcggtgat tgcgatgga ttggcgaaaa 960
ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020
tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctccccctt 1080
ccaccgcgtc agacgcccgt agcagccgc tacgggcttt ttcattgcct gccctagcgt 1140
ccaagcctca cggccgcgt cggcctctct ggcggccttc tggcgctctt ccgcttcctc 1200
gctcactgac tcgctgcgt cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa 1260
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaa 1320
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 1380
ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgtcaagt cagaggtggc gaaacccgac 1440
aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgcgt ctctgttcc 1500
gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctcct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccatcctttt 1620
tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttctgttaga ctttccttgg tgtatccaac 1680
ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tccttcttca 1740
ctgtccctta ttgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg 1800
ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860
agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttcagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
aggcggcggc ggcggcatg agcctgtcgg cctacctgt ggccgtcggc cagggtaca 1980
aatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcatc aatggcgacc 2040
tgggccgcct gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccgcgc acggcgcggt 2100
tcggtgatgc cagatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160

gcaaggtcat gatgggcgtg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
aacggccggg ggggtgcgcgt gattgccaaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280
gacttcgcgg agctgggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
gacgctcacc gggctgggtg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400
cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgcgggc gttgtggata 2460
cctcgcgga aacttggccc tctactgacag atgaggggcg gacgttgaca cttgaggggc 2520
cgactcacc ggcgcggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgaggg gegcgactac 2700
tgacagatga ggggcgcgat cttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaaggggtt 2820
ccgcccgttt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880
aaaccttggt ttttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
tgccccccct tctcgaacct tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc ccccaggggc 3000
tgcgcccctc ggccgcgaac ggcctcacc caaaaatggc agcgctggca gtccttgcca 3060
ttgcgggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
ttgacgtgcc gcaggtgctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcatgg 3240
cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcgggg gccgtgctcg 3300
tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgaggtg ataggtaaga ttataccgag 3360
gtatgaaaac gagaattgga cttttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420
ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540
ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaaact 3600
tgcatggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccctat agcttgtaaa ttctatcata 3660
attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720
tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt 3780
gctgcctcag attcagggtta tgccgctcaa ttcgctgcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840
gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca ggggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900

cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gccccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960
atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaaacagc cagcgctggc 4020
gcgatttagc cccgacatag cccactgtt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080
tgcccggctg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140
cgtgttgagg ccaacgcccc taatgcgggc tgttgcccgg catccaacgc cattcatggc 4200
catatcaatg attttctggg gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260
ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtg ttttgccgtt 4320
acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca cccataattg 4440
tggtttcaaa atcgggctccg tcgatactat gttatacggc aactttgaaa acaactttga 4500
aaaagctggt ttctgggtatt taagggttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560
cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
taaattggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680
gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggatatata agctggtggg agaaaatgaa 4740
aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800
gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggc cctgcacttt 4860
gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cttttgctcg 4920
gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
aggctctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg attttttaa gacggaaaag 5160
cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280
gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggaagaaca gtatgtcgag 5340
ctattttttg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatTTTA 5400
ctggatgaat tgTTTTtagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
caccgacttc ttccgcatca agtgTTTTgg ctctcaggcc gaggccacg gcaagtatTT 5520
gggcaagggg tcgctgggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640

ggcaccaggc ggggtcaaadc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtagag tcgggggcaat 5700
cccgcaagga ggggtgaatga atcgggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
cgacgcggggg ttttcggccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820
gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatgggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880
gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgccccgc ccatcgccg ccgtggagcg 5940
ttcgcgtcgt ctgcaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060
cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
ttccttggtc gatattgcgc cgtggccgga cccgatgcga gcgatgccaa acgacacggc 6180
ccgtctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240
ggtcattttc caggtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctcg agctgcgggc 6300
cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360
cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg 6420
ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480
cacgtccgac cgcggtgggc acctggaatc ggtgtcgctg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540
ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600
gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac 6660
ggccccgacgg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgcg tcaagctgga 6720
aaccttccgc ctcatgtgcg gatcggatcc caccgcgctg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
cggcgaagcc tcggaagagt tgccaggcag cggcctgggtg gaacacgcct ggggtcaatga 6840
tgacctgggtg cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900
agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960
tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttgag cggccgacgt gcaggatttc 7080
cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag 7140
cacgaggaga aaaagcccat ggaggcggtc gctgaacggt tcgagatgc cgtggcattc 7200
ggcgccctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctc tcaaacagga ggacggcccc 7260
aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga 7320
ggggtcgccc gtatgctgct gcgggcggtt ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380

cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcatcttca tcctcggcgc acttaatat 7440
tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggcgg ggtcgcgcg 7500
acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcatct ctgccgctct gctaggtagc 7560
ccgatacgat tgatggcggc cctgggggct atttgcggaa ctgcgggcgt ggcgctgttg 7620
gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcggggcg 7680
gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctccgt gctctgctc 7740
acctttaccg cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagt 7800
tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct 7920
acagttgttt cttactggg ctttctcagc ccagatctg ggtcgtatca gccggggatg 7980
catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcgggtg agcaatggat 8040
aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttcctcag 8100
cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160
cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata 8220
tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
tcacccgtgt ttcaaaccgc gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccgga ctgatgggct 8400
gcctgtatcg agtgggtgatt ttgtgccgag ctgccggctc gggagctgtt ggctggctgg 8460
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520
gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
tgcccttcac cgcttgccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
gcaggcgaaa atcctgtttg atggtggttc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
agaatagccc gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa 8760
gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820
tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa 8880
ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaaac tggcgagaaa 8940
ggaagggag aaagcgaaag gagcgggcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
gatcggtgcg ggctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060
gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120

aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataattt attgataaaa taacaagtca 9180
ggattattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240
tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300
tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatac cgtcgaagct 9360
agcttggggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420
tcggggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagctct 9480
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac 9660
agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgata gacaagaccg 9720
gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttgggtggc gaatgggcag 9780
gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatacag ccatgatgga tactttctcg 9840
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900
tcccttcccc cttcagtga c acgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960
agccacgata gccgcgctgc ctgcctctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc 10020
ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080
ccgattgtct gttgtgcca gtcatacgcc aatagcctct ccacccaagc ggccggagaa 10140
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260
agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320
acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380
tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaacggt cttgtccgc 10440
gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgata ttgatcccct 10500
gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560
cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620
gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcggt 10680
ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
actggctttc tacgtgttcc gcttccttta gcagcccttg cgccctgagt gcttgoggca 10800
gcgtgaagct tgcatacctg caggctcgac gcgcgcggag ctctcgagc aaatttacac 10860

attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt ttactatgt gtgttatgta 10920
 ttgtatttgc gataaatttt tatatttggt actaaattta taacaccttt tatgctaacg 10980
 ttgtccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt ctaaattatt ttgtcttct 11040
 aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga 11100
 attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg ttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160
 ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220
 ttgtaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt 11280
 taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatattt 11340
 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400
 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cacgattata atttcttcat 11520
 agccagcaga tctgccggca tcgatcccg gccatggcct gctttaatga gatatgcgag 11580
 acgcctatga tcgcatgata ttgtctttca attctgttgt gcacgttgta aaaaacctga 11640
 gcatgtgtag ctcagatcct taccgccggt ttccggttcat tctaataat atatcaccgg 11700
 ttactatcgt atttttatga ataataattct ccgttcaatt tactgattgt ccgtcgacga 11760
 gctcggcgcg cctctagagg atcgatgaat tcagatcggc tgagtggctc cttcaacggt 11820
 gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc gtcacggcg ggggtcataa 11880
 cgtgactccc ttaattctcc gtcatgate agattgtcgt ttccgcctt cagtttaaac 11940
 tatcagtgtt tgacaggata tattggcggg taaacctaag agaaaagagc gtttattaga 12000
 ataatcggat atttaaaagg gcgtgaaaag gtttatcctt cgtccatttg tatgtgcatg 12060
 ccaaccacag ggttcccca 12079

<210> 23

<211> 13002

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> pflanzlicher Expressionsvektor mit zwei
Promotor-Terminator-Expressionskassetten

<400> 23

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60

gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgcc 120

tagtgggcggtg tgacgtcggtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccg cagcaccggc 180
ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtataaaa gtgtcaagca 360
tgacaaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420
gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaaactgg cggaacgggtt gggggttcag cagccggcgc 480
tttactggca cttcaggaac aagcgggcgc tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660
ccggcacgcg accggggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720
gcgaggcggg tttttcggcc ggggacgccc tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780
ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcggcgga 840
ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tgccggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900
ccggtccgga cgcagcgctt gagcaggac tcgcggtgat tgcgatgga ttggcgaaaa 960
ggaggctcgt tgcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020
tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctccccctt 1080
ccaccgcgtc agacgccgt agcagccgc tacgggcttt ttcattgcct gccctagcgt 1140
ccaagcctca cggccgcgt cggcctctct ggccgcttc tggcgctctt ccgcttcctc 1200
gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaa 1260
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaa 1320
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 1380
ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac 1440
aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaaagctc ctcgctgcgt ctctgttcc 1500
gacctgccc cttaccggat acctgtccgc cttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttccgtatat ccatcctttt 1620
tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttctgttaga ctttccttgg tgtatccaac 1680
ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tccttcttca 1740
ctgtccctta ttgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgca ggctggccgg 1800
ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860

agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
aggcggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggctaca 1980
aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcac aatggcgacc 2040
tgggccgcct gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgacccgcgc acggcgcggt 2100
tcggtgatgc cagcatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160
gcaaggatcat gatgggcgtg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
aacggccggg ggggtgcggt gattgccaa gacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280
gacttcgcgg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
gacgctcacc gggctggttg cctcgcgcgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400
cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgcccgc gttgtggata 2460
cctcgcggaa aacttggccc tctactgacag atgagggggcg gacgttgaca cttgaggggc 2520
cgactcacc ggcgcgcggt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700
tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgagggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820
ccgcccgttt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatattat 2880
aaaccttggt ttttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
tgccccccct tctcgaacct tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc cccaggggc 3000
tgogcccctc ggccgcgaac ggcctcacc caaaaatggc agcgtggca gtccttgcca 3060
ttgccgggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
ttgacgtgcc gcaggtgctg gcacgcacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcatgg 3240
cggggccggc aatttttacc ttgggcatte ttggcatagt ggtcgcgggt gccgtgctcg 3300
tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgagggt ataggtaaga ttataccgag 3360
gtatgaaaac gagaattgga cttttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420
ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540
ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600

tgcatggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660
attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720
tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt 3780
gctgcctcag attcagggtta tgccgctcaa ttcgctgcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840
gcagctttcc cttcaggcgg gattcatata gcggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900
cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960
atacgtgcg cacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaaacagc cagcgctggc 4020
gcgatttagc cccgacatag cccactggt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080
tgcccggctg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140
cgtgttgagg ccaacgcccc taatgcgggc tgttgcccgg catccaacgc cattcatggc 4200
catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260
ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtgc ttttgccgtt 4320
acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataaattg 4440
tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500
aaaagctgtt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560
cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
taaattggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680
gtaaaagata cggaagggaat gtctcctgct aaggatatata agctgggtgg agaaaatgaa 4740
aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800
gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggt cctgcacttt 4860
gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920
gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
aggctctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg attttttaaa gacggaaaag 5160
cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280
gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg ggaagaaca gtatgtcgag 5340

ctatatttttg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaat'aaaata ttatatattta 5400
ctggatgaat tgtttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
caccgacttc ttccgcatca agtgtttttg ctctcaggcc gagggccacg gcaagtattt 5520
gggcaagggg tcgctgggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
ggcaccaggc ggggtcaaatac aggaataagg gcacattgcc ccggcggtgag tcggggcaat 5700
cccgcaagga ggggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
cgacgcgggg ttttcgccc aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820
gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatgggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880
gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcggcog ccgtggagcg 5940
ttcgcgctcg ctcgaaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacagggtcag 6060
cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
ttccttggtc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgccaa acgacacggc 6180
ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240
ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctc agctgcgggc 6300
cgacgatgac gaactgggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360
cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctgggt cgatcaatgg 6420
ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480
cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgctg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540
ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcggtgct 6600
gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac 6660
ggccccgacg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgcg tcaagctgga 6720
aaccttccgc ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctgggt gaacacgcct ggggtcaatga 6840
tgacctgggt cattgcaaac gctagggcct tgtgggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900
agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960
tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttggag cggccgacgt gcaggatttc 7080

cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag 7140
cacgaggaga aaaagcccat ggaggcggtc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200
ggcgccctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcgggtct tcaaacagga ggacggcccc 7260
aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga 7320
ggggtcgccc gtatgctgct gcgggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380
cgacagattc caacgggaat ctgggtgatg cgcattctca tcctcggcgc acttaatat 7440
tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggagg ggtcgcggcg 7500
acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggc gtgttcatct ctgccgctct gctaggtagc 7560
ccgatacgat tgatggcggt cctgggggct atttgcggaa ctgcgggcgt ggcgctgttg 7620
gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcgggggag 7680
gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgctc 7740
acctttaccg cctggcaact ggcgggccga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagtg 7800
tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct 7920
acagttgttt ctttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980
catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcgggt agcaatggat 8040
aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttcctcag 8100
cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160
cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata 8220
tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
tcacccgtgt ttcaaaccgc gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccga ctgatgggct 8400
gcctgtatcg agtggtgatt ttgtgcgag ctgccggctc gggagctgtt ggctggctgg 8460
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520
gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
tgcccttcac cgcctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
gcaggcgaat atcctgtttg atggtgggtc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
agaatagccc gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa 8760
gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820

tgaaccatca cccaaatcaa gtttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa 8880
ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940
ggaaggggaag aaagcgaag gagcggggcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
gatcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa aggggggatgt gctgcaaggc 9060
gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120
aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataattt attgataaaa taacaagtca 9180
ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaat cagaaatatt 9240
tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300
tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcggggggatc cgtcgaagct 9360
agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420
tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag ccattogcc gccagctct 9480
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac 9660
agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg 9720
gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttgggtggc gaatgggcag 9780
gtagccggat caagcgtatg cagccgcgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgccccaa tagcagccag 9900
tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960
agccacgata gccgcgctgc ctcgctcctg agttcattca gggcaccgga caggtcggtc 10020
ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080
ccgattgtct gttgtgcca gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260
agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320
acgcgcaata atgggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380
tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtcccgc 10440
gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgatc ttgatcccct 10500
gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560

cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620
gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcgctt 10680
ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
actggctttc tacgtgttcc gcttccttta gcagcccttg cgccttgagt gcttgcgcca 10800
gcgtgaagct tgcattgcctg caggctcgacg gcgcgccgag ctccctcgagc aaatttacac 10860
attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920
tttgatttgc gataaatttt tatatttggg actaaattta taacaccttt tatgctaacy 10980
tttgccaaca cttagcaatt tgcaagtga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct 11040
aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga 11100
attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160
ggatggcata tacacaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220
tttgagggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt 11280
taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatatatt 11340
tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400
aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataagagga 11460
ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cacgattata atttcttcat 11520
agccagccca ccgcggtggg cggccgcctg cagtctagaa ggcctcctgc tttaatgaga 11580
tatgcgagac gcctatgata gcatgatatt tgctttcaat tctgttgtgc acgttgtaaa 11640
aaacctgagc atgtgtagct cagatcctta ccgcgggttt cggttcattc taatgaatat 11700
atcaccctgt actatcgat ttttatgaat aatattctcc gttcaattta ctgattgtcc 11760
gtcgagcaaa tttacacatt gccactaaac gtctaaacct ttgtaatttg tttttgtttt 11820
actatgtgtg ttatgtattt gatttgcgat aaatttttat atttggtact aaatttataa 11880
caccttttat gctaacgttt gccaacactt agcaatttgc aagttgatta attgattcta 11940
aattattttt gtcttctaaa tacatatact aatcaactgg aatgtaaat atttgctaata 12000
attttacta taggagaatt aaagtgagt aatatggtag cacaagggtt ggagatttaa 12060
ttgttgcaat gctgcatgga tggcatatac accaaacatt caataattct tgaggataat 12120
aatggtacca cacaagattt gaggtgcatg aacgtcacgt ggacaaaagg tttagtaatt 12180
tttcaagaca acaatgttac cacacacaag ttttgagggt catgcatgga tgccctgtgg 12240
aaagtttaaa aatatttttg aaatgatttg catggaagcc atgtgtaaaa ccatgacatc 12300

cacttggagg atgcaataat gaagaaaact acaaatttac atgcaactag ttatgcatgt 12360
 agtctatata atgaggattt tgcaatactt tcattcatac acactcacta agttttacac 12420
 gattataatt tcttcatagc cagcggatcc gatatcgggc ccgctagcgt taaccctgct 12480
 ttaatgagat atgcgagacg cctatgatcg catgatattt gctttcaatt ctgttggtgca 12540
 cgttgtaaaa aacctgagca tgtgtagctc agatccttac cgccggtttc gggttcattct 12600
 aatgaatata tcacccgtta ctatcgtatt tttatgaata atattctcog ttcaatttac 12660
 tgattgtccg tcgacgaatt cgagctcggc ggcctctag aggatcgatg aattcagatc 12720
 ggctgagtgg ctcttcaac gttgcggttc tgtcagttcc aaacgtaaaa cggcttgctc 12780
 cgcgtcatcg gcgggggtca taacgtgact cccttaattc tccgctcatg atcagattgt 12840
 cgtttcccg cttcagttta aactatcagt gtttgacagg atatattggc gggtaaacct 12900
 aagagaaaag agcgtttatt agaataatcg gatatttaaa agggcgtgaa aagggttatc 12960
 cttcgtccat ttgtatgtgc atgccaacca cagggttccc ca 13002

<210> 24

<211> 13905

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> pflanzlicher Expressionsvektor mit drei
Promotor-Terminator-Expressionskassetten

<400> 24

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
 gcgcccagca cagggtgcga ggcaaattgc accaacgcat acagcgcagc cagaatgcc 120
 tagtgggccc tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccgc cagcaccggc 180
 ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360
 tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420
 gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacgggt ggggggttcag cagccggcgc 480
 tttactggca cttcaggaac aagcgggcgc tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
 cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
 ggaatgcccg cagcttcagg caggcgtgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660
 ccggcacgcg accgggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720

gcgagggcggg tttttcggcc ggggacgccg tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780
ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcggcggca 840
ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tcggggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900
ccggtccgga cgcagcgctc gagcaggggac tcgcggtgat tgtcgatgga ttggcgaaaa 960
ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020
tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080
ccaccgcgtc agacgcccgt agcagccgcg tacgggcttt ttcattgccct gccctagcgt 1140
ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggccggccttc tggcgctctt ccgcttcctc 1200
gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaa 1260
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgctt ctggcgcttt tccataggct 1380
ccgccccctc gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac 1440
aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctcgctgcgt ctctgttcc 1500
gacctgccc cttaccgat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttccgtatat ccctctttt 1620
tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttccttgg tgtatccaac 1680
ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccaccgcg gagcgggtgt tccttcttca 1740
ctgtccctta ttgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg 1800
ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860
agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
aggcggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggttaca 1980
aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcatc aatggcgacc 2040
tgggccgcct gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccgcgc acggcgcggt 2100
tcggtgatgc cagcatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160
gcaaggatcat gatgggcgtg gtccgcccca gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
aacggccggg gggtgcgctg gattgccaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280
gacttcgagg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
gacgtcacc gggctgggtg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400
cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc gttgtggata 2460

cctcgcggaa aacttggtccc tcaactgacag atgagggggcg gacgttgaca cttgagggggc 2520
cgactcaccg ggcgcggcgt tgacagatga ggggcagggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcgggtattga cacttgaggg ggcgcactac 2700
tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgagggggcag agtgctgaca gatgagggggc 2760
gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaaggggtt 2820
ccgcccgttt ttccggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880
aaaccttggt tttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
tgccccccct tctcgaacc tcccgcccg ctaacgcggg cctcccatcc ccccaggggc 3000
tgcccccctc ggcgcggaac ggcctcacc caaaaatggc agcgttgga gtccttgcca 3060
ttgccgggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
ttgacgtgcc gcaggtgctg gcacgcacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcattg 3240
cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcgggt gccgtgctcg 3300
tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgaggtg ataggtaga ttataccgag 3360
gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420
ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540
ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600
tgcatggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaa ttctatcata 3660
attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatgtt cagataatgc ccgatgactt 3720
tgtcatgcag ctccaccgat ttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccagg 3780
gctgcctcag attcagggtta tgccgctcaa ttcgctgcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840
gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gcggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900
cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cgcctatagt cgttcaccga 3960
atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaacagc cagcgtggc 4020
gcgatttagc cccgacatag cccactgtt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080
tgcccggtg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140
cgtgttgagg ccaacgcca taatgcgggc tggtgcccg catccaacgc cattcatggc 4200

catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260
ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt cgggcggtgc ttttgccgtt 4320
acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca cccataattg 4440
tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500
aaaagctgtt ttctgggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560
cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
taaattggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680
gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggtatata agctggtggg agaaaatgaa 4740
aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaagga ccacctatga tgtggaacgg 4800
gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggt cctgcacttt 4860
gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920
gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
aggctctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg atttttttaa gacggaaaag 5160
cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280
gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggaagaaca gtatgtcgag 5340
ctattttttg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatatta 5400
ctggatgaat tgtttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
caccgacttc ttccgcatca agtgttttgg ctctcaggcc gaggccacg gcaagtattt 5520
gggcaagggg tcgctgggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
ggcaccaggc ggggtcaaatac aggaataagg gcacattgcc cggcggtgag tcggggcaat 5700
cccgcaagga ggggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
cgacgcgggg ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820
gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatgggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880
gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgccccgc ccacggccg ccgtggagcg 5940

ttcgcgtcgt ctccaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060
cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
ttccttggtc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgccaa acgacacggc 6180
ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaâcaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaâcaa 6240
ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc 6300
cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360
cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggg cgatcaatgg 6420
ccggtattac acgaaggcgc aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480
cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgcgt ctgcaccgct tccgcgtcct 6540
ggaccgtggc aagaaaaegt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600
gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac 6660
ggcccgacgg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgcg tcaagctgga 6720
aaccttccgc ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgctg aagaagtggc gcgagcagg 6780
cggcgaagcc tgccaagagt tgcgaggcag cggcctgggtg gaacacgcct ggggtcaatga 6840
tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtgggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900
agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gtcgacgca cttgcttcgc 6960
tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattââââ 7020
ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggccttgag cggccgacgt gcaggatttc 7080
cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag 7140
cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgctc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200
ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctc tcaaâcagga ggacggcccc 7260
aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgââââ gcgaggccga 7320
ggggtcgccg gtatgctgct gcgggcgctg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380
cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcatttca tctcggcgc acttaatatt 7440
tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccgggcgg ggtcgcggcg 7500
acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcattc ctgccgctc gctaggtâgc 7560
ccgatacgat tgatggcggg cctgggggct atttcgggaa ctgcgggcgt ggcgctgttg 7620
gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcgggggcg 7680

gtttccatgg cgttcgggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccggt gcctctgctc 7740
acctttaccg cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagtg 7800
tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actdgaacct 7920
acagttgttt ccttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980
catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcgggtg agcaatggat 8040
aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttcctcag 8100
cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagtcc tcaagatcga cagcctgtca 8160
cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata 8220
tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
tcatccgtgt ttcaaaccg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccggg ctgatgggct 8400
gcctgtatcg agtgggtgatt ttgtgccgag ctgccggctg gggagctggt ggctggctgg 8460
tggcaggata tattgtgggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520
gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
tgcccttcac cgcttgccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgccca 8640
gcaggcgaaa atcctgtttg atgggtggttc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
agaatagccc gagatagggg tgagtgttgt tccagtttg aacaagagtc cactattaaa 8760
gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820
tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtgcaggtgc cgtaaagcac taaatcgga 8880
ccctaaaggg agcccccgat ttagagcttg acggggaaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940
ggaaggggaag aaagcgaaa gagcggggcg cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
gatcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060
gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120
aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataatt attgataaaa taacaagtca 9180
ggatattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaat cagaaatatt 9240
tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtatgat aaagactgag tgcgatatta 9300
tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360
agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420

tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcgggtcag cccattcgcc gccaaagctct 9480
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg toctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac 9660
agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgato gacaagaccg 9720
gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttgggtggtc gaatgggcag 9780
gtagccggat caagcgtatg cagccgcgcg attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900
tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960
agccacgata gccgcgctgc ctgcctctgc agttcattca gggcacccgga caggtcggtc 10020
ttgacaaaaa gaaccgggcg ccctcgctgac gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080
ccgattgtct gttgtgcca gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260
agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320
acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380
tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc 10440
gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgatc ttgatccct 10500
gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560
cttaccagag ggcccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620
gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgctt 10680
ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
actggctttc tacgtgttcc gtttcttta gcagccctg cgccctgagt gcttgccgca 10800
gcgtgaagct tgcctgcctg caggctgacg gcgcgccgag ctctcgagc aaatttacac 10860
attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920
tttgatttgc gataaatttt tatatttggg actaaattta taacacctt tatgctaacg 10980
tttgccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt cttaaattatt tttgtcttct 11040
aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga 11100
attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160

ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220
tttgagggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt 11280
taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatattt 11340
tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400
aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460
ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cacgattata atttcttcat 11520
agccagccca ccgcggtggg cggccgcctg cagtctagaa ggcctcctgc tttaatgaga 11580
tatgcgagac gcctatgatc gcatgatatt tgctttcaat tctgttgtgc acgttgtaaa 11640
aaacctgagc atgtgtagct cagatcctta ccgccggttt cggttcattc taatgaatat 11700
atcacccgtt actatcgtat ttttatgaat aatattctcc gttcaattta ctgattgtcc 11760
gtcgagcaaa tttacacatt gccactaaac gtctaaacct ttgtaatttg tttttgtttt 11820
actatgtgtg ttatgtattt gatttgcat aaatttttat atttggtact aaatttataa 11880
caccttttat gctaacgttt gccaacactt agcaatttgc aagttgatta attgattcta 11940
aattattttt gtcttctaaa tacatatact aatcaactgg aaatgtaa atttgcta at 12000
atttctacta taggagaatt aaagtgagt aatatggtac cacaaggttt ggagatttaa 12060
ttgttgcaat gctgcatgga tggcatatac accaaacatt caataattct tgaggataat 12120
aatggtacca cacaagattt gaggtgcatg aacgtcacgt ggacaaaagg tttagtaatt 12180
tttcaagaca acaatgttac cacacacaag ttttgagggt catgcatgga tgccctgtgg 12240
aaagtttaaa aatatttttg aaatgatttg catggaagcc atgtgtaaaa ccatgacatc 12300
cacttgagg atgcaataat gaagaaaact acaaatttac atgcaactag ttatgcatgt 12360
agtctatata atgaggattt tgcaatactt tcattcatac acactcacta agttttacac 12420
gattataatt tcttcatagc cagcggatcc gatatcgggc ccgctagcgt taacctgct 12480
ttaatgagat atgcgagacg cctatgatcg catgatattt gctttcaatt ctgttgtgca 12540
cgttgtaaaa aacctgagca tgtgtagctc agatccttac cgcgggtttc ggttcattct 12600
aatgaatata tcacctgtta ctatcgtatt tttatgaata atattctccg ttcaatttac 12660
tgattgtccg tcgagcaaat ttacacattg ccactaaacg tctaaacct tgtaatttgt 12720
ttttgtttta ctatgtgtgt tatgtatttg atttgcgata aatttttata tttggtacta 12780
aatttataac accttttatg ctaacgtttg ccaacactta gcaatttgca agttgattaa 12840
ttgattctaa attatttttg tcttctaaat acatatacta atcaactgga aatgtaaata 12900

ttgctaata tttctactat aggagaatta aagtgagtga atatggtacc acaaggtttg 12960
 gagatttaat tgttgcaatg ctgcatggat ggcatataca ccaaacattc aataattctt 13020
 gaggataata atggtaccac acaagatttg aggtgcatga acgtcacgtg gacaaaaggt 13080
 ttagtaat tccaagacaa caatgttacc acacacaagt ttgaggtgc atgcatggat 13140
 gccctgtgga aagtttaaaa atattttgga aatgatttgc atggaagcca tgtgtaaaac 13200
 catgacatcc acttgaggga tgcaataatg aagaaaacta caaatttaca tgcaactagt 13260
 tatgcatgta gtctatataa tgaggatttt gcaatacttt cattcataca cactcactaa 13320
 gttttacacg attataat tttcatagcc agcagatctg ccggcatcga tcccgggcca 13380
 tggcctgctt taatgagata tgcgagacgc ctatgatcgc atgatatttg ctttcaattc 13440
 tgttgtgcac gttgtaaaaa acctgagcat gtgtagctca gatccttacc gccggtttcg 13500
 gttcattcta atgaatatat caccggttac tatcgtat tttatgaataa tattctccgt 13560
 tcaatttact gattgtccgt cgacgagctc ggcgcgcctc tagaggatcg atgaattcag 13620
 atcggctgag tggctccttc aacgttgccg ttctgtcagt tccaaacgta aaacggcttg 13680
 tcccgctca tcggcggggg tcataacgtg actcccttaa ttctccgctc atgatcagat 13740
 tgtcgtttcc cgccttcagt ttaactatc agtgtttgac aggatattatt ggccgggtaaa 13800
 cctaagagaa aagagcgttt attagaataa tcggatattt aaaagggcgt gaaaagggtt 13860
 atccttcgct catttgtatg tgcatgcaa ccacagggtt ccca 13905

<210> 25

<211> 15430

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> pflanz. Expressionsvektor mit zwei Promotor-Terminator-Expressionskassetten inseriert ist
 Physcomitrella patens Elongase und Desaturase

<220>

<221> CDS

<222> (11543)..(12415)

<220>

<221> CDS

<222> (13313)..(14890)

<400> 25

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60

gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaadcgc atcagcgccag cagaatgcc 120

tagtgggaggc tgacgtcggt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccg cagcaccggc 180
ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360
tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420
gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacgggt ggggggttcag cagccggcgc 480
tttactggca cttcaggaac aagcggggcg tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattcatg 660
ccggcacgcg accggggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720
gcgagggcggg tttttcggcc ggggacggcg tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780
ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcggcggca 840
ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tgccggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900
ccggtccgga cgcagcgctt gagcagggac tcgcggtgat tgtcgatgga ttggcgaaaa 960
ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020
tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080
ccaccgcgtc agacgcccggt agcagcccgc tacgggcttt ttcattgcct gccctagcgt 1140
ccaagcctca cggcgcgct cggcctctct gggggccttc tggcgctctt ccgcttcctc 1200
gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaa 1260
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 1380
ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgtcaagt cagaggtggc gaaacccgac 1440
aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaaagctc ctcgtgcgct ctctgttcc 1500
gacctgccc cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
ccgctgcata acctgtctt ggggtcatta tagcgatttt ttccgtatat ccattctttt 1620
tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttccttgg tgtatccaac 1680
ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tcttcttca 1740
ctgtccctta ttgcacctg gcggtgctca accgggaatc tgctctgcga ggctggccgg 1800
ctaccgccg cgtaacagat gagggaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860

agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
aggcggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggctaca 1980
aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcac aatggcgacc 2040
tgggccgcct gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccca cgaccgcgc acggcgcggt 2100
tcggtgatgc cagatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160
gcaaggtcat gatgggcgtg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
aacggccggg ggggtgcgct gattgccaa caggtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280
gacttcgcgg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
gacgctcacc gggctggttg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400
cgcgccagaa acgccgtcga agcctgtgct gagacaccgc ggccgcccgc gttgtggata 2460
cctcgcgga aacttggccc tcaactgacag atgagggggc gacgttgaca cttgaggggc 2520
cgactcacc ggcgcgcgct tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700
tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820
ccgcccgttt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatatat 2880
aaaccttggt tttaaccagg gctgcgccct gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
tgccccccct tctcgaacct tcccgccccg ctaacgcggg cctcccatcc cccagggggc 3000
tgcgccccct ggccgcgaac ggcctcacc caaaaatggc agcgctggca gtccttgcca 3060
ttgcggggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
ttgacgtgcc gcaggtgctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cgccgtcggg ggcatcacg gacttcatgg 3240
cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcggggt gccgtgctcg 3300
tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgagggt ataggtaaga ttataccgag 3360
gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactotat gaagcgccat atttaaaaag 3420
ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540
ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaaact 3600

tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660
attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccatgactt 3720
tgtcatgcag ctccaccgat ttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt 3780
gctgcctcag attcagggtta tgccgctcaa ttogctgcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840
gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca ggggccagcc atccgctcat catatcacca 3900
cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gccccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960
atacgtgctc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaacagc cagcgtggc 4020
gcgatttagc cccgacatag cccactggt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080
tgcccggctg tatgcgcgag gttaccgact ggggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140
cgtgttgagg ccaacgccc taatgcgggc tgttgcccgg catccaacgc cattcatggc 4200
catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260
ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtc ttttgccgtt 4320
acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataattg 4440
tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500
aaaagctgtt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560
cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
taaattggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680
gtaaaagata cggaagggaat gtctcctgct aaggatatata agctggtggg agaaaatgaa 4740
aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800
gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggt cctgcacttt 4860
gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920
gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
aggctctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
gaagaagaca ctccatttaa agatccggcg gagctgtatg attttttaaa gacggaaaag 5160
cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtgggat 5280
gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggaagaaca gtatgtcgag 5340

ctatatttttg acttactggg gatcaagcct gattggggaga aaataaaaata ttatatttta 5400
ctggatgaat tgtttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
caccgacttc ttccgcatca agtgtttttg ctctcaggcc gagggccacg gcaagtattt 5520
gggcaagggg tcgctgggtat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
gggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
ggcaccaggc ggggtcaaatac aggaataagg gcacattgce ccggcgtgag tcggggcaat 5700
cccgcgaagga ggggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
cgacgcgggg ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgctgic 5820
gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatgggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880
gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccacggtccg ccgtggagcg 5940
ttcgcgtcgt ctgcaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060
cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120
ttccttggtc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgccaa acgacacggc 6180
ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccc cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240
ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctc agctgcgggc 6300
cgacgatgac gaactgggtg ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360
cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggg cgatcaatgg 6420
ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480
cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540
ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600
gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac 6660
ggcccgacgg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga 6720
aaccttccgc ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
cggcgaagcc tgcaagagt tgcgaggcag cggcctgggtg gaacacgcct ggggtcaatga 6840
tgacctgggt cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900
agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960
tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttggag cggccgacgt gcaggatttc 7080

cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tggtcgggtc cgtttacgag 7140
cacgaggaga aaaagcccat ggaggcggtc gctgaacggg tgcgagatgc cgtggcattc 7200
ggcgectaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcgggtct tcaaacagga ggacggcccc 7260
aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga 7320
ggggtcgcgc gtatgctgct gggggcggtt cgggggggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380
cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcattctca tcctcggcgc acttaatat 7440
tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccggggcg ggctcggcg 7500
acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggc gtgttcatct ctgccgctct gctaggtagc 7560
ccgatacgat tgatggcggt cctgggggct atttgcggaa ctgcgggcgt ggcgctggtg 7620
gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtgcggcgtc cagcgggcct ggcggggcg 7680
gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctccgt gcctctgctc 7740
acctttaccg cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagtg 7800
tttgatccgc caatccgat gctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgc actcgaacct 7920
acagttgttt ccttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980
catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcgggt agcaatggat 8040
aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttctcag 8100
cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160
cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata 8220
tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
tcacccgtgt ttcaaaccg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccgga ctgatgggct 8400
gcctgtatcg agtggtgatt ttgtgccgag ctgccggtcg gggagctggt ggctggctgg 8460
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520
gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
tgcccttcac cgcctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
gcaggcgaaa atcctgtttg atgggtgggtc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
agaatagccc gagatagggt tgagtgtgt tccagtttg aacaagagtc cactattaaa 8760
gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820

tgaaccatca cccaaatcaa gtttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa 8880
ccetaaaggg agccccgat ttagagcttg acgggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940
ggaaggggaag aaagcgaaag gagcggggcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
gatcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa aggggggatgt gctgcaaggc 9060
gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120
aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataattt attgataaaa taacaagtca 9180
gggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240
tcaataactg attatattcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300
tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcggggggatc cgtcgaagct 9360
agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420
tcggggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagtct 9480
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaa 9660
agttcgggtg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg 9720
gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttgggtggc gaatgggcag 9780
gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900
tcccttcccc cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaaacgc cgtcgtggcc 9960
agccacgata gccgcgctgc ctgctcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc 10020
ttgacaaaaa gaaccggggc cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080
ccgattgtct gttgtgcccc gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggcgggagaa 10140
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataacc aggggaattt atggaacgtc 10260
agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320
acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380
tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc 10440
gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgatc ttgatccct 10500
gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560

ttgttttact	atgtgtgtta	tgtatttgat	ttgcgataaa	tttttatatt	tggtactaaa	12735
tttataacac	cttttatgct	aacgtttgcc	aacacttagc	aatttgcaag	ttgattaatt	12795
gattctaaat	tatttttgtc	ttctaaatac	atatacta	caactggaaa	tgtaaataatt	12855
tgctaataatt	tctactatag	gagaattaa	gtgagtgaat	atggtaccac	aaggtttgga	12915
gatttaattg	ttgcaatgct	gcatggatgg	catatacacc	aaacattcaa	taattcttga	12975
ggataataat	ggtaccacac	aagatttgag	gtgcatgaac	gtcacgtgga	caaaagggtt	13035
agtaattttt	caagacaaca	atgttaccac	acacaagttt	tgagggtgcat	gcatggatgc	13095
cctgtggaaa	gtttaaaaat	attttgga	tgatttgc	ggaagccatg	tgtaaaacca	13155
tgacatccac	ttggaggatg	caataatgaa	gaaaactaca	aatttacatg	caactagtta	13215
tgcatgtagt	ctatataatg	aggattttgc	aatactttca	ttcatacaca	ctcactaagt	13275
tttacacgat	tataatttct	tcatagccag	cggatcc	atg gta ttc gcg ggc ggt		13330
				Met Val Phe Ala Gly Gly		
				295		
gga ctt cag cag ggc tct ctc gaa gaa aac atc gac gtc gag cac att						13378
Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn Ile Asp Val Glu His Ile						
300			305		310	
gcc agt atg tct ctc ttc agc gac ttc ttc agt tat gtg tct tca act						13426
Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe Ser Tyr Val Ser Ser Thr						
315			320		325	
gtt ggt tcg tgg agc gta cac agt ata caa cct ttg aag cgc ctg acg						13474
Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln Pro Leu Lys Arg Leu Thr						
330			335		340	345
agt aag aag cgt gtt tcg gaa agc gct gcc gtg caa tgt ata tca gct						13522
Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala Val Gln Cys Ile Ser Ala						
350			355		360	
gaa gtt cag aga aat tcg agt acc cag gga act gcg gag gca ctc gca						13570
Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly Thr Ala Glu Ala Leu Ala						
365			370		375	
gaa tca gtc gtg aag ccc acg aga cga agg tca tct cag tgg aag aag						13618
Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg Ser Ser Gln Trp Lys Lys						
380			385		390	
tcg aca cac ccc cta tca gaa gta gca gta cac aac aag cca agc gat						13666
Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val His Asn Lys Pro Ser Asp						
395			400		405	
tgc tgg att gtt gta aaa aac aag gtg tat gat gtt tcc aat ttt gcg						13714
Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Phe Ala						
410			415		420	425
gac gag cat ccc gga gga tca gtt att agt act tat ttt gga cga gac						13762

Asp	Glu	His	Pro	Gly	Gly	Ser	Val	Ile	Ser	Thr	Tyr	Phe	Gly	Arg	Asp		
				430					435					440			
ggc	aca	gat	gtt	ttc	tct	agt	ttt	cat	gca	gct	tct	aca	tgg	aaa	att	13810	
Gly	Thr	Asp	Val	Phe	Ser	Ser	Phe	His	Ala	Ala	Ser	Thr	Trp	Lys	Ile		
			445					450					455				
ctt	caa	gac	ttt	tac	att	ggt	gac	gtg	gag	agg	gtg	gag	ccg	act	cca	13858	
Leu	Gln	Asp	Phe	Tyr	Ile	Gly	Asp	Val	Glu	Arg	Val	Glu	Pro	Thr	Pro		
		460					465					470					
gag	ctg	ctg	aaa	gat	ttc	cga	gaa	atg	aga	gct	ctt	ttc	ctg	agg	gag	13906	
Glu	Leu	Leu	Lys	Asp	Phe	Arg	Glu	Met	Arg	Ala	Leu	Phe	Leu	Arg	Glu		
	475					480					485						
caa	ctt	ttc	aaa	agt	tcg	aaa	ttg	tac	tat	gtt	atg	aag	ctg	ctc	acg	13954	
Gln	Leu	Phe	Lys	Ser	Ser	Lys	Leu	Tyr	Tyr	Val	Met	Lys	Leu	Leu	Thr		
490					495					500					505		
aat	gtt	gct	att	ttt	gct	gcg	agc	att	gca	ata	ata	tgt	tgg	agc	aag	14002	
Asn	Val	Ala	Ile	Phe	Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	Ile	Ile	Cys	Trp	Ser	Lys		
				510					515					520			
act	att	tca	gcg	gtt	ttg	gct	tca	gct	tgt	atg	atg	gct	ctg	tgt	ttc	14050	
Thr	Ile	Ser	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Ala	Cys	Met	Met	Ala	Leu	Cys	Phe		
			525					530					535				
caa	cag	tgc	gga	tgg	cta	tcc	cat	gat	ttt	ctc	cac	aat	cag	gtg	ttt	14098	
Gln	Gln	Cys	Gly	Trp	Leu	Ser	His	Asp	Phe	Leu	His	Asn	Gln	Val	Phe		
		540					545					550					
gag	aca	cgc	tgg	ctt	aat	gaa	gtt	gtc	ggg	tat	gtg	atc	ggc	aac	gcc	14146	
Glu	Thr	Arg	Trp	Leu	Asn	Glu	Val	Val	Gly	Tyr	Val	Ile	Gly	Asn	Ala		
	555					560					565						
gtt	ctg	ggg	ttt	agt	aca	ggg	tgg	tgg	aag	gag	aag	cat	aac	ctt	cat	14194	
Val	Leu	Gly	Phe	Ser	Thr	Gly	Trp	Trp	Lys	Glu	Lys	His	Asn	Leu	His		
570					575					580				585			
cat	gct	gct	cca	aat	gaa	tgc	gat	cag	act	tac	caa	cca	att	gat	gaa	14242	
His	Ala	Ala	Pro	Asn	Glu	Cys	Asp	Gln	Thr	Tyr	Gln	Pro	Ile	Asp	Glu		
				590					595					600			
gat	att	gat	act	ctc	ccc	ctc	att	gcc	tgg	agc	aag	gac	ata	ctg	gcc	14290	
Asp	Ile	Asp	Thr	Leu	Pro	Leu	Ile	Ala	Trp	Ser	Lys	Asp	Ile	Leu	Ala		
			605					610					615				
aca	gtt	gag	aat	aag	aca	ttc	ttg	cga	atc	ctc	caa	tac	cag	cat	ctg	14338	
Thr	Val	Glu	Asn	Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	Leu	Gln	Tyr	Gln	His	Leu		
		620					625					630					
ttc	ttc	atg	ggt	ctg	tta	ttt	ttc	gcc	cgt	ggt	agt	tgg	ctc	ttt	tgg	14386	
Phe	Phe	Met	Gly	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Arg	Gly	Ser	Trp	Leu	Phe	Trp		
	635					640					645						
agc	tgg	aga	tat	acc	tct	aca	gca	gtg	ctc	tca	cct	gtc	gac	agg	ttg	14434	
Ser	Trp	Arg	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Val	Leu	Ser	Pro	Val	Asp	Arg	Leu		
650					655					660					665		

ttg gag aag gga act gtt ctg ttt cac tac ttt tgg ttc gtc ggg aca 14482
 Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr Phe Trp Phe Val Gly Thr
 670 675 680

gcg tgc tat ctt ctc cct ggt tgg aag cca tta gta tgg atg gcg gtg 14530
 Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Leu Val Trp Met Ala Val
 685 690 695

act gag ctc atg tcc ggc atg ctg ctg ggc ttt gta ttt gta ctt agc 14578
 Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly Phe Val Phe Val Leu Ser
 700 705 710

cac aat ggg atg gag gtt tat aat tcg tct aaa gaa ttc gtg agt gca 14626
 His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser Lys Glu Phe Val Ser Ala
 715 720 725

cag atc gta tcc aca cgg gat atc aaa gga aac ata ttc aac gac tgg 14674
 Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly Asn Ile Phe Asn Asp Trp
 730 735 740 745

ttc act ggt ggc ctt aac agg caa ata gag cat cat ctt ttc cca aca 14722
 Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr
 750 755 760

atg ccc agg cat aat tta aac aaa ata gca cct aga gtg gag gtg ttc 14770
 Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala Pro Arg Val Glu Val Phe
 765 770 775

tgt aag aaa cac ggt ctg gtg tac gaa gac gta tct att gct acc ggc 14818
 Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Ile Ala Thr Gly
 780 785 790

act tgc aag gtt ttg aaa gca ttg aag gaa gtc gcg gag gct gcg gca 14866
 Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu Val Ala Glu Ala Ala Ala
 795 800 805

gag cag cat gct acc acc agt taa gctagcgtta accctgcttt aatgagatat 14920
 Glu Gln His Ala Thr Thr Ser
 810 815

gcgagacgcc tatgatcgca tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg ttgtaaaaaa 14980

cctgagcatg tgtagctcag atccttaccg ccggtttcgg ttcattctaa tgaatatatc 15040

accggttact atcgtatttt tatgaataat attotccgtt caatttactg attgtccgtc 15100

gacgaattcg agctcggcgc gcctctagag gatcgatgaa ttcagatcgg ctgagtggct 15160

cettcaacgt tgcggttctg tcagttccaa acgtaaaacg gcttgtcccg cgtcatcggc 15220

gggggtcata acgtgactcc cttaattctc cgtcatgat cagattgtcg tttcccgcct 15280

tcagttttaa ctatcagtgt ttgacaggat atattggcgg gtaaacctaa gagaaaagag 15340

cgtttattag aataatcgga tattttaaag ggcgtgaaaa ggtttatcct tcgtccattt 15400

gtatgtgcat gccaacca gggttcccca 15430

<210> 26
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> Unknown

<400> 26

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser
 1 5 10 15

Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp
 20 25 30

Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile
 35 40 45

Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu
 50 55 60

Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu
 65 70 75 80

Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser
 85 90 95

Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr
 100 105 110

Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile
 115 120 125

Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr
 130 135 140

Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His
 145 150 155 160

Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His
 165 170 175

His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly
 180 185 190

Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg
 195 200 205

Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu
 210 215 220

Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr
 225 230 235 240

Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile
 245 250 255

Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr
 260 265 270

Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys
 275 280 285

Thr Glu
 290

<210> 27
 <211> 525
 <212> PRT
 <213> Unknown

<400> 27

Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn
 1 5 10 15

Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe
 20 25 30

Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln
 35 40 45

Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala
 50 55 60

Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly
 65 70 75 80

Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg
 85 90 95

Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val
 100 105 110

His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr
 115 120 125

Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser
 130 135 140

Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala
 145 150 155 160

Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu
 165 170 175

Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg
 180 185 190

Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr
 195 200 205

Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala
 210 215 220

Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys
 225 230 235 240

Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe
 245 250 255
 Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly
 260 265 270
 Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys
 275 280 285
 Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr
 290 295 300
 Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp
 305 310 315 320
 Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile
 325 330 335
 Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg
 340 345 350
 Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu
 355 360 365
 Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr
 370 375 380
 Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro
 385 390 395 400
 Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly
 405 410 415
 Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser
 420 425 430
 Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly
 435 440 445
 Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu
 450 455 460
 His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala
 465 470 475 480
 Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp
 485 490 495
 Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu
 500 505 510
 Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser
 515 520 525

<210> 28

<211> 17752

<212> DNA
 <213> Unknown

<220>

<223> pflanz. Expressionsvektor mit 3
 Promotor-Terminator- Expressionskassetten
 inseriert mit Physcomitrella Elongase + Desaturase
 + Phaeodactylum Desaturase

<220>

<221> CDS

<222> (11543)..(12415)

<220>

<221> CDS

<222> (13313)..(14890)

<220>

<221> CDS

<222> (15791)..(17200)

<400> 28

```

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcac acagcgccag cagaatgcc 120
tagtgggchg tgacgtcggt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccgg cagcaccggc 180
ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
atgttggggt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtataaaa gtgtcaagca 360
tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgcgcgcct ggacctgttg aacgaggtcg 420
gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacgggt gggggttcag cagccggcgc 480
tttactggca cttcaggaac aagcgggchg tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
cggagaatca tacgcattcg gtgcccagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660
ccggcacchg accgggchgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720
gcgaggcggg ttttccggcc ggggacgcg tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780
ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cggggcgga 840
ccgttgaaca ggctccgctc tcgcccgtgt tgcggggcgc gatagacgcc ttgcagcaag 900
ccggtccgga cgcagcgctt gagcaggggc tcgcggtgat tgtcgatgga ttggcgaaaa 960
ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020
tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080

```

ccaccgcgtc agacgcccgt agcagcccgc tacgggcttt ttcattgccct gccctagcgt 1140
ccaagcctca ogggccgcgt cggcctctct ggccggccttc tggcgctctt ccgcttcctc 1200
gctcactgac tcgctgcgtc cggctggttc gctgcggcga gcgggtatcag ctactcaaa 1260
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgcttt tccataggct 1380
ccgccccct gaagagcatc aaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac 1440
aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctctgcgct ctctgttcc 1500
gaccctgccg ctaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
ccgctgcata acctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccctctttt 1620
tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttcttggt tgtatccaac 1680
ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tccttcttca 1740
ctgtccctta ttcgcacctg gcgggtctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg 1800
ctaccgccgg cgtaacagat gagggaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860
agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920
agggcgccgc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgt ggccgtcggc cagggtaca 1980
aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggccgcctc aatggcgacc 2040
tgggcccgcct gggcgccctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccgcgc acggcgcggt 2100
tcgggtgatgc cagcatctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160
gcaaggctcat gatgggcgtg gtccgccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220
aacggccggg ggggtgcgct gattgccaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280
gacttcgcgg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340
gacgctcacc gggctggttg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400
cgccccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgccggc gttgtggata 2460
cctcgcgaa aacttgccc tctactgacag atgaggggag gacgttgaca cttgaggggc 2520
cgactcacc ggcgcggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580
gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640
gatgtggaca agcctgggga taagtgcct gcggattga cacttgaggg gcgcgactac 2700
tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760
gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820

ccgcccgttt ttccggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880
aaaccttggt tttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940
tgccccccct tctcgaacct tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc cccagggggc 3000
tgccccctc ggccgcgaac ggccctaccc caaaaatggc agcgcctggca gtccttgcca 3060
ttgcccggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120
ttgacgtgcc gcaggtgctg gcacgcacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180
gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cggccgtcgg ggcatcacg gacttcattg 3240
cggggccggc aattttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcgggt gccgtgctcg 3300
tggttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgagggt ataggtaaga ttataccgag 3360
gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420
ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480
tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540
ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600
tgcatggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660
attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720
tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccagggt 3780
gctgcctcag attcaggtta tgccgctcaa ttcgctgcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840
gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca ggggccagcc atccgtcatc catatcacca 3900
cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960
atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaaacagc cagcgctggc 4020
gcgatttagc cccgacatag cccactggt cgtccatttc cgcgagacg atgacgtcac 4080
tgcccggctg tatgcgcgag gttaccgact ggggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140
cgtgttgagg ccaacgcca taatgcgggc tgttgcccg catccaacgc cattcatggc 4200
catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260
ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtg ttttgccgtt 4320
acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380
agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataattg 4440
tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500
aaaagctggt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560

cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620
taaattggcta aaatgagaat atcacgggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680
gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggatatata agctgggtggg agaaaatgaa 4740
aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800
gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaagggt cctgcacttt 4860
gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920
gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980
aggctctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040
ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100
gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg atttttttaa gacggaaaag 5160
cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220
gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280
gacattgcct tctgcgtccg gtcgatcagg gaggatatcg gggaagaaca gtatgtcgag 5340
ctatTTTTTg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatTTTt 5400
ctggatgaat tgttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460
caccgacttc ttccgcatca agtgTTTTg ctctcaggcc gaggccacg gcaagtattt 5520
gggcaagggg tcgctggat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580
cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640
ggcaccaggc ggggtcaaatac aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700
cccgaagga ggggtgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760
cgacgcgggg ttttccgccc aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820
gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880
gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgccccgc ccatcggccg ccgtggagcg 5940
ttcgcgtcgt ctggaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000
aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060
cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aatgcagct 6120
ttccttgttc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgcaa acgacacggc 6180
ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240
ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc 6300

cgacgatgac gaactgggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360
cgagccgatac accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggg cgatcaatgg 6420
ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480
cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540
ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgac gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600
gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgccgac 6660
ggcccgcgac atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga 6720
aaccttccgc ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt 6780
cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctgggtg gaacacgcct ggggtcaatga 6840
tgacctgggtg cattgcaaac gctagggcct tgtgggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900
agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcggggcact gtcgacgca cttgcttcgc 6960
tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020
ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttggag cggccgacgt gcaggatttc 7080
cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tggtcgggtc cgtttacgag 7140
cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgctc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200
ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctt tcaaacagga ggacggcccc 7260
aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga 7320
ggggtcgccc gtatgctgct gcgggcgttg ccggcggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380
cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcattctca tcctcgggc acttaattatt 7440
tcgctattct ggagcttgtt gtttatttcg gtctaccgc tgccggggcg ggtcgcggcg 7500
acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggc gtgttcatt ctgccgctct gctaggtagc 7560
ccgatacgat tgatggcggc cctgggggct atttgcggaa ctgcgggcgt ggcgctgttg 7620
gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcggggcg 7680
gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctccgt gcctctgctc 7740
acctttaccg cctggcaact ggcgccgga ggacttctgc tcgttcagat agctttagt 7800
tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860
ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgc actcgaacct 7920
acagttgttt ccttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980
catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctga ccattcgggtg agcaatggat 8040

aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttcctcag 8100
cggttttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatoga cagcctgtca 8160
cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata 8220
tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280
tcatccgtgt ttcaaaccgg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340
gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccggg ctgatgggct 8400
gcctgtatcg agtgggtgatt ttgtgccgag ctgccggctg gggagctgtt ggctggctgg 8460
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520
gacgttttta atgtactggg gtgggttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580
tgcccttcac cgctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640
gcaggcgaaa atcctgtttg atgggtggtc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700
agaatagccc gagatagggg tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa 8760
gaacgtggac tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820
tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtgcagggtc cgtaaagcac taaatcgga 8880
ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940
ggaaggggag aaagcgaaag gagcgggcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000
gatcgggtgc ggctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060
gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120
aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataattt attgataaaa taacaagtca 9180
ggattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaat cagaaatatt 9240
tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300
tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360
agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420
tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaactct 9480
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540
ccacagtoga tgaatccaga aaagcggcca ttttcacca tgatatccg caagcaggca 9600
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaa 9660
agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg 9720
gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag 9780

gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tacttttctcg 9840
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900
tcccttcccg cttcagtgc aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgctcgtggcc 9960
agccacgata gccgcgctgc ctgcctctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc 10020
ttgacaaaaa gaaccggggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080
ccgattgtct gttgtgcccc gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200
tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260
agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320
acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380
tgagtggctc cttcaacgtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc 10440
gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gtcatgac ttgatccct 10500
gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560
cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaacggccca 10620
gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgogtt 10680
ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgcgg 10740
actggctttc tacgtgttcc gcttccttta gcagcccttg cgccctgagt gcttgccgca 10800
gcgtgaagct tgcatgcctg caggtcgacg gcgcgcgag ctctcgcagc aaatttacac 10860
attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920
tttgatttgc gataaatttt tataatttgg actaaattta taacaccttt tatgctaacg 10980
tttgccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct 11040
aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgct aatatttcta ctataggaga 11100
attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160
ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220
tttgagggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt 11280
taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatatatt 11340
tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400
aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460
ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cagattata atttcttcat 11520

agccagccca ccgcggtgga aa atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag 11572
Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu
1 5 10

ttg gat ggg aag gtc tcg cag ggc gtg aat gca ttg ctg ggt agt ttt 11620
Leu Asp Gly Lys Val Ser Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe
15 20 25

ggg gtg gag ttg acg gat acg ccc act acc aaa ggc ttg ccc ctc gtt 11668
Gly Val Glu Leu Thr Asp Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val
30 35 40

gac agt ccc aca ccc atc gtc ctc ggt gtt tct gta tac ttg act att 11716
Asp Ser Pro Thr Pro Ile Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile
45 50 55

gtc att gga ggg ctt ttg tgg ata aag gcc agg gat ctg aaa ccg cgc 11764
Val Ile Gly Gly Leu Leu Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg
60 65 70

gcc tcg gag cca ttt ttg ctc caa gct ttg gtg ctt gtg cac aac ctg 11812
Ala Ser Glu Pro Phe Leu Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu
75 80 85 90

ttc tgt ttt gcg ctc agt ctg tat atg tgc gtg ggc atc gct tat cag 11860
Phe Cys Phe Ala Leu Ser Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln
95 100 105

gct att acc tgg cgg tac tct ctc tgg ggc aat gca tac aat cct aaa 11908
Ala Ile Thr Trp Arg Tyr Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys
110 115 120

cat aaa gag atg gcg att ctg gta tac ttg ttc tac atg tct aag tac 11956
His Lys Glu Met Ala Ile Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr
125 130 135

gtg gaa ttc atg gat acc gtt atc atg ata ctg aag cgc agc acc agg 12004
Val Glu Phe Met Asp Thr Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg
140 145 150

caa ata agc ttc ctc cac gtt tat cat cat tct tca att tcc ctc att 12052
Gln Ile Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile
155 160 165 170

tgg tgg gct att gct cat cac gct cct ggc ggt gaa gca tat tgg tct 12100
Trp Trp Ala Ile Ala His His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser
175 180 185

gcg gct ctg aac tca gga gtg cat gtt ctc atg tat gcg tat tac ttc 12148
Ala Ala Leu Asn Ser Gly Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe
190 195 200

ttg gct gcc tgc ctt cga agt agc cca aag tta aaa aat aag tac ctt 12196
Leu Ala Ala Cys Leu Arg Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu
205 210 215

ttt tgg ggc agg tac ttg aca caa ttc caa atg ttc cag ttt atg ctg 12244
Phe Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu

220	225	230	
aac tta gtg cag gct tac tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca			12292
Asn Leu Val Gln Ala Tyr Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro			
235	240	245	250
caa tgg ctg atc aag att ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt			12340
Gln Trp Leu Ile Lys Ile Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe			
255	260	265	
ctt ttc ggc aat ttt tac gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga			12388
Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly			
270	275	280	
aag caa aag gga gct aaa act gag tga tctagaaggc ctcctgcttt			12435
Lys Gln Lys Gly Ala Lys Thr Glu			
285	290		
aatgagatat gcgagacgcc tatgatcgca tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg			12495
ttgtaaaaaa cctgagcatg tgtagctcag atccttaccg ccggtttcgg ttcattctaa			12555
tgaatatatc acccgttact atcgtatttt tatgaataat attctccgtt caatttactg			12615
attgtccgtc gagcaaattt acacattgcc actaaacgtc taaacccttg taatttgttt			12675
ttgttttact atgtgtgtta tgtatttgat ttgcgataaa tttttatatt tgggtactaaa			12735
tttataacac cttttatgct aacgtttgcc aacacttagc aatttgcaag ttgattaatt			12795
gattctaaat tatttttgtc ttctaaatac atatactaata caactggaaa tgtaaatatt			12855
tgctaataatt tctactatag gagaattaaa gtgagtgaat atggtaccac aagggttgga			12915
gatttaattg ttgcaatgct gcatggatgg catatacac aaacattcaa taattcttga			12975
ggataataat ggtaccacac aagatttgag gtgcatgaac gtcacgtgga caaaagggtt			13035
agtaattttt caagacaaca atgttaccac acacaagttt tgaggtgcat gcatggatgc			13095
cctgtggaaa gtttaaaaat attttggaat tgatttgcat ggaagccatg tgtaaaacca			13155
tgacatccac ttggaggatg caataatgaa gaaaactaca aatttacatg caactagtta			13215
tgcatgtagt ctatataatg aggattttgc aatactttca ttcatacaca ctcactaagt			13275
tttacacgat tataatttct tcatagccag cggatcc atg gta ttc gcg ggc ggt			13330
	Met Val Phe Ala Gly Gly		
	295		
gga ctt cag cag ggc tct ctc gaa gaa aac atc gac gtc gag cac att			13378
Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn Ile Asp Val Glu His Ile			
300	305	310	
gcc agt atg tct ctc ttc agc gac ttc ttc agt tat gtg tct tca act			13426
Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe Ser Tyr Val Ser Ser Thr			
315	320	325	

100

gtt ggt tcg tgg agc gta cac agt ata caa cct ttg aag cgc ctg acg	13474
Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln Pro Leu Lys Arg Leu Thr	
330 335 340 345	
agt aag aag cgt gtt tcg gaa agc gct gcc gtg caa tgt ata tca gct	13522
Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala Val Gln Cys Ile Ser Ala	
350 355 360	
gaa gtt cag aga aat tcg agt acc cag gga act gcg gag gca ctc gca	13570
Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly Thr Ala Glu Ala Leu Ala	
365 370 375	
gaa tca gtc gtg aag ccc acg aga cga agg tca tct cag tgg aag aag	13618
Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg Ser Ser Gln Trp Lys Lys	
380 385 390	
tcg aca cac ccc cta tca gaa gta gca gta cac aac aag cca agc gat	13666
Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val His Asn Lys Pro Ser Asp	
395 400 405	
tgc tgg att gtt gta aaa aac aag gtg tat gat gtt tcc aat ttt gcg	13714
Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Phe Ala	
410 415 420 425	
gac gag cat ccc gga gga tca gtt att agt act tat ttt gga cga gac	13762
Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp	
430 435 440	
ggc aca gat gtt ttc tct agt ttt cat gca gct tct aca tgg aaa att	13810
Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala Ala Ser Thr Trp Lys Ile	
445 450 455	
ctt caa gac ttt tac att ggt gac gtg gag agg gtg gag ccg act cca	13858
Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu Arg Val Glu Pro Thr Pro	
460 465 470	
gag ctg ctg aaa gat ttc cga gaa atg aga gct ctt ttc ctg agg gag	13906
Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg Ala Leu Phe Leu Arg Glu	
475 480 485	
caa ctt ttc aaa agt tcg aaa ttg tac tat gtt atg aag ctg ctc acg	13954
Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr Val Met Lys Leu Leu Thr	
490 495 500 505	
aat gtt gct att ttt gct gcg agc att gca ata ata tgt tgg agc aag	14002
Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala Ile Ile Cys Trp Ser Lys	
510 515 520	
act att tca gcg gtt ttg gct tca gct tgt atg atg gct ctg tgt ttc	14050
Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys Met Met Ala Leu Cys Phe	
525 530 535	
caa cag tgc gga tgg cta tcc cat gat ttt ctc cac aat cag gtg ttt	14098
Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe Leu His Asn Gln Val Phe	
540 545 550	
gag aca cgc tgg ctt aat gaa gtt gtc ggg tat gtg atc ggc aac gcc	14146
Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly Tyr Val Ile Gly Asn Ala	

555	560	565	
gtt ctg ggg ttt agt aca ggg tgg tgg aag gag aag cat aac ctt cat Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys Glu Lys His Asn Leu His 570 575 580 585			14194
cat gct gct cca aat gaa tgc gat cag act tac caa cca att gat gaa His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr Tyr Gln Pro Ile Asp Glu 590 595 600			14242
gat att gat act ctc ccc ctc att gcc tgg agc aag gac ata ctg gcc Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp Ser Lys Asp Ile Leu Ala 605 610 615			14290
aca gtt gag aat aag aca ttc ttg cga atc ctc caa tac cag cat ctg Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile Leu Gln Tyr Gln His Leu 620 625 630			14338
ttc ttc atg ggt ctg tta ttt ttc gcc cgt ggt agt tgg ctc ttt tgg Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg Gly Ser Trp Leu Phe Trp 635 640 645			14386
agc tgg aga tat acc tct aca gca gtg ctc tca cct gtc gac agg ttg Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu Ser Pro Val Asp Arg Leu 650 655 660 665			14434
ttg gag aag gga act gtt ctg ttt cac tac ttt tgg ttc gtc ggg aca Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr Phe Trp Phe Val Gly Thr 670 675 680			14482
gcg tgc tat ctt ctc cct ggt tgg aag cca tta gta tgg atg gcg gtg Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Leu Val Trp Met Ala Val 685 690 695			14530
act gag ctc atg tcc ggc atg ctg ctg ggc ttt gta ttt gta ctt agc Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly Phe Val Phe Val Leu Ser 700 705 710			14578
cac aat ggg atg gag gtt tat aat tcc tct aaa gaa ttc gtg agt gca His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser Lys Glu Phe Val Ser Ala 715 720 725			14626
cag atc gta tcc aca cgg gat atc aaa gga aac ata ttc aac gac tgg Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly Asn Ile Phe Asn Asp Trp 730 735 740 745			14674
ttc act ggt ggc ctt aac agg caa ata gag cat cat ctt ttc cca aca Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr 750 755 760			14722
atg ccc agg cat aat tta aac aaa ata gca cct aga gtg gag gtg ttc Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala Pro Arg Val Glu Val Phe 765 770 775			14770
tgt aag aaa cac ggt ctg gtg tac gaa gac gta tct att gct acc ggc Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Ile Ala Thr Gly 780 785 790			14818

act tgc aag gtt ttg aaa gca ttg aag gaa gtc gcg gag gct gcg gca 14866
 Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu Val Ala Glu Ala Ala Ala
 795 800 805

gag cag cat gct acc acc agt taa gctagcgtta accctgcttt aatgagatat 14920
 Glu Gln His Ala Thr Thr Ser
 810 815

gcgagacgcc tatgatcgca tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg ttgtaaaaaa 14980

cctgagcatg tgtagctcag atccttaccg ccggtttcgg ttcattctaa tgaatatatc 15040

accggttact atcgtatttt tatgaataat attctccgtt caatttactg attgtccgtc 15100

gagcaaattt acacattgcc actaaacgtc taaacccttg taatttggtt ttgttttact 15160

atgtgtgtta tgtatttgat ttgcgataaa tttttatatt tgggtactaaa tttataacac 15220

cttttatgct aacgtttgcc aacacttagc aatttgcaag ttgattaatt gattctaaat 15280

tatttttgtc ttctaaatac atatactaata caactggaaa tgtaaataatt tgctaataatt 15340

tctactatag gagaattaaa gtgagtgaat atggtaccac aagggttgga gatttaattg 15400

ttgcaatgct gcatggatgg catatacacc aaacattcaa taattcttga ggataataat 15460

ggtaccacac aagatttgag gtgcatgaac gtcacgtgga caaaagggtt agtaattttt 15520

caagacaaca atgttaccac aacaagttt tgagggtgcat gcatggatgc cctgtggaaa 15580

gtttaaaaat attttggaaa tgatttgcat ggaagccatg tgtaaaacca tgacatccac 15640

ttggaggatg caataatgaa gaaaactaca aatttacatg caactagtta tgcatgtagt 15700

ctatataatg aggattttgc aatactttca ttcatacaca ctactaagt tttacacgat 15760

tataatttct tcatagccag cagatctaaa atg gct ccg gat gcg gat aag ctt 15814
 Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu
 820 825

cga caa cgc cag acg act gcg gta gcg aag cac aat gct gct acc ata 15862
 Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile
 830 835 840

tcg acg cag gaa cgc ctt tgc agt ctg tct tcg ctc aaa ggc gaa gaa 15910
 Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu
 845 850 855

gtc tgc atc gac gga atc atc tat gac ctc caa tca ttc gat cat ccc 15958
 Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro
 860 865 870

ggg ggt gaa acg atc aaa atg ttt ggt ggc aac gat gtc act gta cag 16006
 Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe Gly Gly Asn Asp Val Thr Val Gln
 875 880 885

tac aag atg att cac ccg tac cat acc gag aag cat ttg gaa aag atg 16054
 Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His Thr Glu Lys His Leu Glu Lys Met

103

890	895	900	905	
aag cgt gtc ggc aag gtg acg gat ttc gtc tgc gag tac aag ttc gat				16102
Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp Phe Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp				
910		915	920	
acc gaa ttt gaa cgc gaa atc aaa cga gaa gtc ttc aag att gtg cga				16150
Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys Arg Glu Val Phe Lys Ile Val Arg				
925		930	935	
cga ggc aag gat ttc ggt act ttg gga tgg ttc ttc cgt gcg ttt tgc				16198
Arg Gly Lys Asp Phe Gly Thr Leu Gly Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys				
940		945	950	
tac att gcc att ttc ttc tac ctg cag tac cat tgg gtc acc acg gga				16246
Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu Gln Tyr His Trp Val Thr Thr Gly				
955		960	965	
acc tct tgg ctg ctg gcc gtg gcc tac gga atc tcc caa gcg atg att				16294
Thr Ser Trp Leu Leu Ala Val Ala Tyr Gly Ile Ser Gln Ala Met Ile				
970		975	980	985
ggc atg aat gtc cag cac gat gcc aac cac ggg gcc acc tcc aag cgt				16342
Gly Met Asn Val Gln His Asp Ala Asn His Gly Ala Thr Ser Lys Arg				
990		995	1000	
ccc tgg gtc aac gac atg cta ggc ctc ggt gcg gat ttt att ggt ggt				16390
Pro Trp Val Asn Asp Met Leu Gly Leu Gly Ala Asp Phe Ile Gly Gly				
1005		1010	1015	
tcc aag tgg ctc tgg cag gaa caa cac tgg acc cac cac gct tac acc				16438
Ser Lys Trp Leu Trp Gln Glu Gln His Trp Thr His His Ala Tyr Thr				
1020		1025	1030	
aat cac gcc gag atg gat ccc gat agc ttt ggt gcc gaa cca atg ctc				16486
Asn His Ala Glu Met Asp Pro Asp Ser Phe Gly Ala Glu Pro Met Leu				
1035		1040	1045	
cta ttc aac gac tat ccc ttg gat cat ccc gct cgt acc tgg cta cat				16534
Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Asp His Pro Ala Arg Thr Trp Leu His				
1050		1055	1060	1065
cgc ttt caa gca ttc ttt tac atg ccc gtc ttg gct gga tac tgg ttg				16582
Arg Phe Gln Ala Phe Phe Tyr Met Pro Val Leu Ala Gly Tyr Trp Leu				
1070		1075	1080	
tcc gct gtc ttc aat cca caa att ctt gac ctc cag caa cgc ggc gca				16630
Ser Ala Val Phe Asn Pro Gln Ile Leu Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala				
1085		1090	1095	
ctt tcc gtc ggt atc cgt ctc gac aac gct ttc att cac tcg cga cgc				16678
Leu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asp Asn Ala Phe Ile His Ser Arg Arg				
1100		1105	1110	
aag tat gcg gtt ttc tgg cgg gct gtg tac att gcg gtg aac gtg att				16726
Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala Val Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile				
1115		1120	1125	

104

gct ccg ttt tac aca aac tcc ggc ctc gaa tgg tcc tgg cgt gtc ttt 16774
 Ala Pro Phe Tyr Thr Asn Ser Gly Leu Glu Trp Ser Trp Arg Val Phe
 1130 1135 1140 1145

gga aac atc atg ctc atg ggt gtg gcg gaa tcg ctc gcg ctg gcg gtc 16822
 Gly Asn Ile Met Leu Met Gly Val Ala Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val
 1150 1155 1160

ctg ttt tcg ttg tcg cac aat ttc gaa tcc gcg gat cgc gat ccg acc 16870
 Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe Glu Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr
 1165 1170 1175

gcc cca ctg aaa aag acg gga gaa cca gtc gac tgg ttc aag aca cag 16918
 Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu Pro Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln
 1180 1185 1190

gtc gaa act tcc tgc act tac ggt gga ttc ctt tcc ggt tgc ttc acg 16966
 Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly Gly Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr
 1195 1200 1205

gga ggt ctc aac ttt cag gtt gaa cac cac ttg ttc cca cgc atg agc 17014
 Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu His His Leu Phe Pro Arg Met Ser
 1210 1215 1220 1225

agc gct tgg tat ccc tac att gcc ccc aag gtc cgc gaa att tgc gcc 17062
 Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala
 1230 1235 1240

aaa cac ggc gtc cac tac gcc tac tac ccg tgg atc cac caa aac ttt 17110
 Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe
 1245 1250 1255

ctc tcc acc gtc cgc tac atg cac gcg gcc ggg acc ggt gcc aac tgg 17158
 Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp
 1260 1265 1270

cgc cag atg gcc aga gaa aat ccc ttg acc gga cgg gcg taa 17200
 Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro Leu Thr Gly Arg Ala
 1275 1280 1285

agatctgccg gcacgatcc cgggccatgg cctgctttaa tgagatatgc gagacgccta 17260

tgatcgcacg atattttgctt tcaattctgt tgtgcacggt gtaaaaaacc tgagcatgtg 17320

tagctcagat ccttaccgcc ggtttcgggt cattctaattg aatatatcac ccgttactat 17380

cgtattttta tgaataatat tctccgttca atttactgat tgtccgtcga cgagctcggc 17440

gcgcctctag aggatcgatg aattcagatc ggctgagtgg ctcccttcaac gttgcgggttc 17500

tgtcagttcc aaacgtaaaa cggcttgtcc cgcgtcatcg gcgggggtca taacgtgact 17560

cccttaattc tccgctcatg atcagattgt cgtttccgc cttcagttta aactatcagt 17620

gtttgacagg atatattggc gggtaaacct aagagaaaag agcgtttatt agaataatcg 17680

gatattttaa agggcgtgaa aaggtttatc cttcgtccat ttgtatgtgc atgccaacca 17740

caggggttccc ca

17752

<210> 29

<211> 290

<212> PRT

<213> Unknown

<400> 29

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser
 1 5 10 15

Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp
 20 25 30

Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile
 35 40 45

Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu
 50 55 60

Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu
 65 70 75 80

Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser
 85 90 95

Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr
 100 105 110

Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile
 115 120 125

Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr
 130 135 140

Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His
 145 150 155 160

Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His
 165 170 175

His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly
 180 185 190

Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg
 195 200 205

Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu
 210 215 220

Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr
 225 230 235 240

Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile
 245 250 255

Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr

260 265 270
 Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys
 275 280 285
 Thr Glu
 290
 <210> 30
 <211> 525
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <400> 30
 Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn
 1 5 10 15
 Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe
 20 25 30
 Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln
 35 40 45
 Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala
 50 55 60
 Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly
 65 70 75 80
 Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg
 85 90 95
 Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val
 100 105 110
 His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr
 115 120 125
 Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser
 130 135 140
 Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala
 145 150 155 160
 Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu
 165 170 175
 Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg
 180 185 190
 Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr
 195 200 205
 Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala
 210 215 220
 Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys

107

225		230		235		240
Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe						
		245		250		255
Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly						
		260		265		270
Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys						
		275		280		285
Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr						
		290		295		300
Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp						
		305		310		315
Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile						
		325		330		335
Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg						
		340		345		350
Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu						
		355		360		365
Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr						
		370		375		380
Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro						
		385		390		395
Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly						
		405		410		415
Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser						
		420		425		430
Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly						
		435		440		445
Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu						
		450		455		460
His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala						
		465		470		475
Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp						
		485		490		495
Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu						
		500		505		510
Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser						
		515		520		525

<211> 469
 <212> PRT
 <213> Unknown

<400> 31

```

Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val
  1              5              10              15

Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser
          20              25              30

Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr
          35              40              45

Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe
  50              55              60

Gly Gly Asn Asp Val Thr Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His
  65              70              75              80

Thr Glu Lys His Leu Glu Lys Met Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp
          85              90              95

Phe Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys
          100              105              110

Arg Glu Val Phe Lys Ile Val Arg Arg Gly Lys Asp Phe Gly Thr Leu
          115              120              125

Gly Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu
          130              135              140

Gln Tyr His Trp Val Thr Thr Gly Thr Ser Trp Leu Leu Ala Val Ala
          145              150              155              160

Tyr Gly Ile Ser Gln Ala Met Ile Gly Met Asn Val Gln His Asp Ala
          165              170              175

Asn His Gly Ala Thr Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn Asp Met Leu Gly
          180              185              190

Leu Gly Ala Asp Phe Ile Gly Gly Ser Lys Trp Leu Trp Gln Glu Gln
          195              200              205

His Trp Thr His His Ala Tyr Thr Asn His Ala Glu Met Asp Pro Asp
          210              215              220

Ser Phe Gly Ala Glu Pro Met Leu Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Asp
          225              230              235              240

His Pro Ala Arg Thr Trp Leu His Arg Phe Gln Ala Phe Phe Tyr Met
          245              250              255

Pro Val Leu Ala Gly Tyr Trp Leu Ser Ala Val Phe Asn Pro Gln Ile
          260              265              270

Leu Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala Leu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asp
          275              280              285

```

Asn Ala Phe Ile His Ser Arg Arg Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala
 290 295 300
 Val Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile Ala Pro Phe Tyr Thr Asn Ser Gly
 305 310 315 320
 Leu Glu Trp Ser Trp Arg Val Phe Gly Asn Ile Met Leu Met Gly Val
 325 330 335
 Ala Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe
 340 345 350
 Glu Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu
 355 360 365
 Pro Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly
 370 375 380
 Gly Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu
 385 390 395 400
 His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala
 405 410 415
 Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr
 420 425 430
 Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His
 435 440 445
 Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro
 450 455 460
 Leu Thr Gly Arg Ala
 465